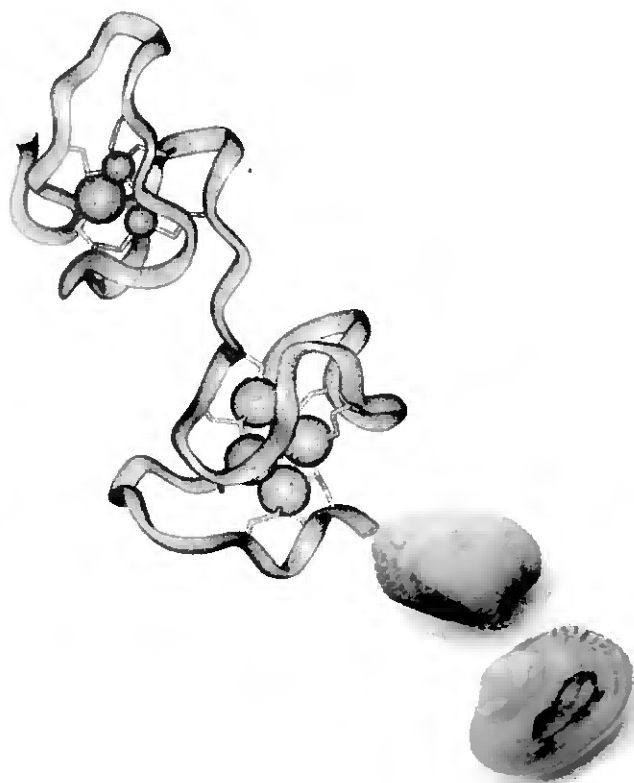




Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Metalotionina como biomarcador de contaminação metálica na amêijoa *Ruditapes decussatus*



Metalotionina como
biomarcador de
contaminação metálica na
amêijoa - Serafim,



TESE de Mestrado de
Angela Pereira Serafim

SD

2004



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Metalotionina como biomarcador de contaminação metálica na amêijoia *Ruditapes decussatus*

*Dissertação apresentada na
Universidade do Algarve para
obtenção do grau de Doutor no
Ramo de Ciências e Tecnologias do
Ambiente na especialidade de
Ambiente Aquático*

Faro • 2004

*

12 11 64 59 233

504.05

SER*MT

1

AGRADECIMENTOS

Ao terminar este trabalho desejo manifestar o meu reconhecimento aos amigos, colegas, familiares, e a todos aqueles que, de uma forma mais ou menos explícita, me apoiaram, colaboraram, criticaram e me encorajaram, contribuindo para a sua concretização. A todos eles um abraço de amizade e gratidão.

Professora Doutora Maria João Bebianno, pela orientação, apoio e interesse demonstrado ao longo deste trabalho, bem como pela leitura crítica e sugestões do mesmo.

Professora Doutora Ana Maria Mota, pela forma como comigo colaborou na realização de alguns ensaios experimentais efectuados no IST, pela sua permanente disponibilidade para me auxiliar e aconselhar.

Doutor Carlos Vale, pelo acolhimento no IPIMAR e pela sua experiência e conselhos nas análises espectrofotométricas e ainda ao Miguel Caetano, pela sua amizade e apoio analítico.

Dr.ª Fernanda Cavaco, pelos sábios ensinamentos e por todo o apoio ao longo deste trabalho.

Dina Simes e Pedro Rodrigues, pelo seu apoio a nível das técnicas cromatográficas e ao Paulo Pedro pelo apoio analítico.

Helena Gonçalves, pela sua amizade e apoio estatístico na análise dos resultados.

Alexandra Cravo, pela sua amizade e interesse demonstrado pelo meu trabalho.

Daniel Lisboa, pelas sugestões feitas e a cuidadosa formatação do manuscrito.

José Cavaco, pela concepção e execução da capa.

Aos meus colegas de laboratório (Belisandra Lopes, Rui Company, Cristina Ferreira, Maria do Rosário Coelho, Miguel Madureira, Filomena Rita, Helena Felicia, Alexandra Marques, Ana Paulino, Luisa Barreira, Denise Fernandes, Florence Geret e a todos aqueles que pelo laboratório passaram deixando mais ou menos recordações), pelas suas sugestões, incentivo e companheirismo. Principalmente a Belisandra Lopes pela sua amizade de longa data e ao Rui Company pelo verdadeiro amigo que se revelou ser e ainda à Mikas que apesar de já não trabalharmos directamente, nunca deixou de ser uma boa colega e amiga.

Paula Serafim, Mónica Lisboa, Silvina Barros e Joana Falardo, pelo total apoio, incentivo e inteira disponibilidade.

Um agradecimento muito especial à Maria Miguel e ao João Miguel, pelo apoio incondicional e extraordinária compreensão pelas horas não partilhadas. E ainda aos meus pais, por tudo e a quem dedico esta tese.

E ainda os sinceros agradecimentos à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela bolsa concedida para o doutoramento.

RESUMO

O objectivo da presente dissertação foi contribuir para a compreensão da aplicação da metalotionina (MT) como biomarcador de contaminação metálica na amêijoia *Ruditapes decussatus*.

A MT sendo uma proteína induzida por metais é susceptível de responder aos diferentes factores que influenciam o metabolismo proteico e ainda a todos os factores que influenciam os teores metálicos, sendo por isso necessário conhecer os factores endógenos e exógenos que podem afectar o indicador, de forma a minimizar fontes de variação não controladas. Desta forma, no Capítulo II foi apresentado um estudo de campo, através do qual se pretendem estudar alguns factores que podem influenciar o papel da MT nesta espécie, nomeadamente a sazonalidade e o sexo dos indivíduos. Neste estudo foi determinada a concentração de MT e de metais (Cd, Cu e Zn) na glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus*, em ambos os sexos. As amêijoas foram recolhidas mensalmente durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) em dois locais da Ria Formosa: um directamente influenciado por fontes antrópicas e o outro afastado da influência urbana. Os resultados mostraram que a concentração de MT e de metais na glândula digestiva não depende do sexo dos organismos. No entanto, a concentração de MT, Cd e Cu depende dos meses do ano e do local de amostragem, sendo máxima nos meses de Julho e Agosto no local com influência antrópica. A concentração de Zn não depende quer dos meses amostrados quer do local, indicando que esta espécie é capaz de regular os níveis deste elemento. De uma forma geral, os resultados deste capítulo mostraram que nesta população de amêijoas a concentração metálica é o factor determinante na síntese de MT.

Em estudos toxicológicos é frequente recorrer-se a ensaios laboratoriais, pois apesar de não conseguirem ser uma cópia fiel das condições ambientais, permitem ajudar a compreender e avaliar os efeitos dos contaminantes. Nesta perspectiva o estudo dos processos de bioacumulação, transferência, armazenamento e eliminação de Cd, Cu e Zn e a sua relação com os níveis de MT nos diferentes tecidos de *R. decussatus* foram abordados nos Capítulos III, IV, V e VI. No Capítulo III foi analisado o papel das MTs no processo de acumulação e de eliminação de Cd em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição a duas concentrações subletais e ambientalmente realistas deste metal (4 e 40 $\mu\text{g l}^{-1}$), seguido por um período de depuração. O capítulo IV teve como objectivo determinar a toxicidade de Cu nesta amêijoia, para posteriormente estudar o envolvimento da MT nos seus tecidos a dois tipos de contaminação: subletal (25 $\mu\text{g l}^{-1}$) e aguda (50 $\mu\text{g l}^{-1}$). Na exposição subletal também se pretendeu compreender o comportamento desta proteína no processo de eliminação deste elemento e ainda, clarificar se este metal estará ligado à MT ou a outras proteínas constituintes da fracção citosólica. No Capítulo V estudou-se o papel da MT na acumulação e eliminação de Zn em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após exposição a duas concentrações diferentes (100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$), seguido por um período de depuração. Os processos de acumulação e de eliminação de Zn, também foram acompanhados pelo estudo da distribuição de Zn pelas diferentes fracções subcelulares e pelos diversos componentes da fracção proteica de baixo peso molecular, de forma a concluir sobre a afinidade deste elemento para os distintos compartimentos celulares. Por último, no Capítulo VI pretendeu-se analisar o papel das MTs no processo de acumulação simultâneo de Cd, Cu e Zn em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição a uma mistura metálica destes metais, na tentativa de uma aproximação do ambiente natural (mistura metálica), a qual permita conhecer a forma como os metais interactivam entre si e consequentemente a forma como são retidos nos diferentes tecidos destes organismos, quer ao nível da sua distribuição subcelular quer da sua ligação à MT. De uma forma geral, a MT foi induzida por todos os metais em estudo, no entanto, essa resposta dependeu dos tecidos analisados, da concentração do metal no meio e da competição entre os metais (efeito da mistura metálica), verificando-se que a inducibilidade de MTs nos tecidos de *R. decussatus* variou da seguinte

forma: $Cu > Cd > Zn$. Por outro lado, os resultados obtidos nos Capítulos III, IV e V mostraram que existem importantes diferenças na cinética de eliminação destes metais nos tecidos desta amêijoia. O Cd é dificilmente eliminado nos tecidos de *R. decussatus*, o Zn é mais rapidamente eliminado, no entanto com uma velocidade inferior à observada para o outro metal essencial (Cu). Em paralelo com a depuração destes metais, uma rápida diminuição da concentração de MT ocorreu, principalmente nos tecidos das amêijoas pré-expostas a Cu. De uma forma geral, verificou-se que o tempo de meia de Cd nos tecidos de *R. decussatus* é superior ao tempo de meia vida estimado para os metais essenciais (Cu e Zn), enquanto, que o tempo de meia vida da MT nos mesmos tecidos é inferior ao dos metais, à excepção do Cu que apresentou o tempo de meia vida mais curto ($t_{1/2} Cd > t_{1/2} Zn > t_{1/2} MT > t_{1/2} Cu$). As diferentes cinéticas de depuração, observadas para cada um dos metais, podem ser explicadas em parte pela rápida degradação dos complexos de MT formados com Cu e Zn, comparativamente com os de Cd, sendo este complexo mais dificilmente eliminado do citoplasma.

No final deste trabalho pretendeu-se aplicar os conhecimentos adquiridos a uma população natural, de forma a generalizar e concluir sobre a utilização desta proteína como biomarcador. O local seleccionado foi a Ria Formosa, devido à abundância da amêijoia *R. decussatus* e dada a importância económica desta espécie e do sistema lagunar. Os resultados descritos no Capítulo VII mostram que, a variação espacial e sazonal da concentração de metais e MT nas brânquias e glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* está relacionada com a diferente biodisponibilidade ambiental de Cd. Este estudo mostrou que a capacidade desta proteína de responder precocemente a um estado de contaminação, difere entre os metais. No caso do Cd, essa capacidade foi demonstrada, pois mesmo em concentrações baixas e ambientalmente realistas deste elemento, a MT é induzida nos diferentes tecidos de *R. decussatus*. Contrariamente, no caso da exposição ao Cu, apesar da resposta desta proteína depender do tempo e da concentração de exposição, a rápida eliminação do complexo MT-Cu em todos os tecidos, limita a sua utilização como biomarcador. Por último, a resposta da MT em função da exposição a Zn, revela que esta proteína não deverá ser utilizada como marcador deste tipo de contaminação, uma vez que só existe indução desta proteína a concentrações elevadas deste elemento. Desta forma, quando se pretende utilizar a MT como biomarcador em áreas litorais marinhas, onde ocorre uma vasta gama de concentrações deste elemento a resposta desta proteína não reflecte as concentrações mais baixas de Zn.

Os resultados deste estudo mostram que os níveis de MT resultam do equilíbrio entre os processos de síntese e de degradação da própria proteína. Mesmo que os processos fisiológicos de desintoxicação que impliquem a MT sejam activados devido à exposição a Cu ou a Zn, este aumento de actividade pode não resultar obrigatoriamente num aumento da concentração de MT, mas pode igualmente corresponder a um aumento da sua taxa de renovação.

De uma forma geral, constatou-se que no estudo de campo a concentração de MT resulta de uma resposta à exposição ao Cd, particularmente nas brânquias e na glândula digestiva onde esta proteína pode ser utilizada como um indicador precoce de exposição ao Cd e um bioindicador útil para aceder ao estado toxicológico nesta população de amêijoas.

SUMMARY

The aim of this dissertation is to contribute for the understanding of metallothionein (MT) relevance as a biomarker of metal contamination in the clam *Ruditapes decussatus*.

MT is a metal inducible protein, susceptible to respond to several factors that influence both protein metabolism and metal levels in the organisms. In this context, the endogenous and exogenous factors that influence this indicator should be identified, in order to minimize the uncontrolled sources of variation. For that reason, a field study was carried out and is presented in Chapter II regarding the identification of some of the factors that influence MT functions in this specie, including seasonal and sex effects. In that study, MT and metal concentrations (Cd, Cu and Zn) were determined in the digestive gland of both males and females of *R. decussatus*. The clams were collected monthly during the period of sexual differentiation (from July to September) from two sites in the Ria Formosa Lagoon: one with direct anthropogenic influences and another distant from urban sources. The results show that MT and metal concentrations are not sex dependent. However, the concentrations of MT, Cd and Cu varied with season and sampling site, and were significantly higher in July and August in the site with anthropogenic influences. Zn concentrations remained unchanged throughout the sampling months and in the two sites, suggesting this specie is capable to regulate the levels of this metal. Therefore, the most influencing factor for MT synthesis in this natural population of *R. decussatus* seems to be the metal concentrations.

Laboratory assays are commonly used in toxicological research studies and represent an important tool to understand and evaluate the effects of contaminants, although not completely representative of the natural environmental complexity. In this perspective, the processes of bioaccumulation, transference, storage and elimination of Cd, Cu and Zn were studied as well as the relation of these metals with MT levels within the different tissues of *R. decussatus* and are accessible in Chapters III, IV, V and VI.

Chapter III regards the role of MTs in Cd accumulation and elimination processes in different tissues of *R. decussatus* after two environmental realistic sublethal exposures (4 and 40 $\mu\text{g l}^{-1}$), followed by a depuration period. The aim of Chapter IV was to previously determine the toxicity of Cu in this clam, and subsequently study the role of MT after a sublethal (25 $\mu\text{g l}^{-1}$) and acute (50 $\mu\text{g l}^{-1}$) Cu exposure. The sublethal exposure also allowed to study MT function during Cu elimination, and clarifies if this metal is binding to MTs or to other cytosolic constituent proteins. In Chapter V the role of MT in Zn accumulation and elimination was investigated in several tissues of *R. decussatus*, after two Zn exposures (100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$), followed by a depuration period. During Zn accumulation and elimination processes, subcellular distribution of Zn and low molecular weight fraction components containing this metal were also considered, in order to conclude on the affinity of this element in the several cellular compartments.

Finally, Chapter VI focused on the role of MT during the simultaneous accumulation of Cd, Cu and Zn in different tissues *R. decussatus*, after a metal mixture exposure, attempting to express the natural environment conditions. This polymetallic experiment takes into account the importance of metal interactions, and consequently the mechanisms of cellular distribution within the tissues and MT binding properties.

In general, all metals studied induced the synthesis of MT, even though it depended largely of the tissues analysed, the environmental metal concentrations and metal competition (metal mixture effect). MT induction in the tissues of *R. decussatus* varied following $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$. On the other hand, results obtained in Chapters III, IV and V showed remarkable differences in the metal elimination kinetics in the tissues of this clam. Cd is not easily eliminated from the tissues. Zn is the metal more rapidly eliminated from the tissues, however with a lower elimination rate when compared to the other essential metal studied (Cu).

During metal depuration period, a simultaneous and rapid decrease of MT concentrations occurred in the tissues, particularly in the clams pre-exposed to Cu. Generally, Cd half-life in the tissues of *R. decussatus* was significantly higher when compared to those exhibited by essential metals (Cu and Zn). MT half-life in the same tissues was shorter than the metals, with exception to Cu ($t_{1/2} \text{ Cd} > t_{1/2} \text{ Zn} > t_{1/2} \text{ MT} > t_{1/2} \text{ Cu}$). The differences observed in depuration kinetics between the three metals can be explained in some extent by the fast degradation of MT-Cu and MT-Zn complexes compared to MT-Cd. Consequently, MT-Cd complexes are more difficultly eliminated from the cytoplasm.

To complete this work, the information obtained was tested in a natural population, in order to predict and confirm the use of this protein as a biomarker. The Ria Formosa Lagoon is a very important ecological system and was selected in this study since the clam *R. decussatus* is particularly abundant and represents an economically relevant natural resource. Chapter VII pointed out that the spatial and seasonal variation found in metal and MT concentrations in the gills and digestive gland of the clam *R. decussatus* is associated to fluctuations in environmental bioavailability of Cd.

This study showed the MT potential to respond as an early warning marker of contamination is metal dependent. MT can be used with that intent toward Cd, since at low and realistic concentrations of this metal, MT is induced in the different tissues of *R. decussatus*. Contrarily, in relation to Cu contamination, although MT synthesis depended on the time and concentration of exposure, the fast elimination of MT-Cu complex limits its use as biomarker. Finally, the MT response following Zn exposure indicates that this protein is not a useful biomarker for this metal. Induction of MT occurs only at environmental unrealistic levels of Zn. When MT is used in monitoring programs for coastal zones, where a large range of Zn levels can be found, the response of this protein does not reflect the concentrations of this metal.

From the results of the present study, it is suggested that MT levels in the organisms are the consequence of equilibrium between protein synthesis and degradation. In fact, when detoxification processes controlling MT are activated after Cu and Zn exposures, it may not necessarily increase MT levels, but rather enhance the protein turnover rate.

To conclude, MT concentrations in the field depend essentially of Cd exposure, particularly in the gills and digestive gland, where MTs can be used as an early indicator of Cd exposure and must be considered a useful biomarker to assess the toxicological status on this natural population of clams.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Summary	v
Índice	vii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xix
Símbolos, Acrónimos e Abreviaturas	xxv

Capítulo I

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. METAIS NO MEIO AQUÁTICO	4
1.1.1. TOXICIDADE DOS METAIS	5
1.1.2. CÁDMIO	7
1.1.2.1. Ocorrência	7
1.1.2.2. Fontes	8
1.1.2.3. Toxicidade	8
1.1.3. COBRE	10
1.1.3.1. Ocorrência	10
1.1.3.2. Fontes	10
1.1.3.3. Toxicidade	11
1.1.4. ZINCO	13
1.1.4.1. Ocorrência	13
1.1.4.2. Fontes	14
1.1.4.3. Toxicidade	14
1.1.5. FACTORES QUE INFLUENCIAM A ACUMULAÇÃO METÁLICA NOS ORGANISMOS	16
1.1.5.1. Factores físico-químicos	16
1.1.5.2. Interações metálicas	17
1.1.5.3. Parâmetros alométricos	18
1.1.5.4. Factores sazonais	19
1.1.5.5. Factores genéticos	19
1.1.5.6. Estratégias que limitam a incorporação de metais nos organismos ..	20
1.1.6. PENETRAÇÃO DOS METAIS ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR	20
1.1.7. METABOLISMO CELULAR DOS METAIS	23
1.1.7.1. Distribuição subcelular dos metais	26

1.2. METALOTIIONINAS.....	27
1.2.1. ESTRUTURA DAS METALOTIIONINAS	28
1.2.1.1. Estrutura primária.....	28
1.2.1.2. Estrutura terciária.....	32
1.2.2. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS METALOTIIONINAS	33
1.2.3. SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DAS METALOTIIONINAS	34
1.2.4. FUNÇÃO DAS METALOTIIONINAS	36
1.2.5. TEORES DE METALOTIIONINAS EM INVERTEBRADOS MARINHOS.....	38
1.2.5.1. Factores que influenciam os teores de MTs nos organismos.....	38
1.2.6. METALOTIIONINA COMO BIOMARCADOR	40
1.3. OBJECTIVO DA TESE	41

Capítulo II	Variação da concentração de metalotionina e de metais na glândula digestiva da amêijoia <i>Ruditapes decussatus</i>: Efeito sazonal e sexual
--------------------	---

2.1. INTRODUÇÃO.....	49
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.3. RESULTADOS.....	56
2.4. DISCUSSÃO.....	67

Capítulo III	Cinética de acumulação e de depuração de cádmio nos tecidos da amêijoia <i>Ruditapes decussatus</i>: Resposta da metalotionina
---------------------	---

3.1. INTRODUÇÃO.....	75
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	79
3.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	79
3.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
3.3. RESULTADOS	82
3.3.1. CONCENTRAÇÃO DE Cd NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	82
3.3.1.1. Acumulação de Cd	83
3.3.1.2. Eliminação de Cd.....	90
3.3.2. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	94
3.3.2.1. Indução de MT.....	94

3.3.2.2. Eliminação	96
3.3.3. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE Cd NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	97
3.4. DISCUSSÃO	100

Capítulo IV Toxicidade, acumulação e eliminação de cobre nos tecidos da amêijoia *Ruditapes decussatus*: Comportamento da metalotionina

4.1. INTRODUÇÃO.....	111
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	116
4.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	116
4.2.1.1. Ensaio de toxicidade	116
4.2.1.2. Ensaios de acumulação e eliminação	117
4.2.1.3. Ensaios cromatográficos.....	118
4.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	120
4.3. RESULTADOS	121
4.3.1. TOXICIDADE DE Cu NA AMÊIJOA <i>R. decussatus</i>	121
4.3.2. CONCENTRAÇÃO DE Cu NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	123
4.3.2.1. Acumulação de Cu.....	107
4.3.2.2. Eliminação de Cu	134
4.3.3. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	139
4.3.3.1. Indução de MT.....	139
4.3.3.2. Eliminação.....	147
4.3.4. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE Cu NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	150
4.4. DISCUSSÃO	153

Capítulo V Acumulação e eliminação de zinco nos tecidos da amêijoia *Ruditapes decussatus*: Envolvimento da metalotionina

5.1. INTRODUÇÃO.....	163
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	167

5.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	167
5.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	168
5.3. RESULTADOS	169
5.3.1. CONCENTRAÇÃO DE Zn NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	169
5.3.1.1. Acumulação de Zn	170
5.3.1.2. Eliminação de Zn	176
5.3.2. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	180
5.3.2.1. Indução de MT.....	180
5.3.2.2. Eliminação	184
5.3.3. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE Zn NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	185
5.4. DISCUSSÃO.....	188

Capítulo VI **Cinética de acumulação de cádmio, cobre e zinco nos tecidos da
amêijoas *Ruditapes decussatus* após exposição a uma mistura
metálica: O papel da metalotionina**

6.1. INTRODUÇÃO.....	199
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	203
6.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	203
6.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	204
6.3. RESULTADOS	205
6.3.1. CONCENTRAÇÃO METÁLICA NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	205
6.3.1.1. Concentração de Cd.....	211
6.3.1.2. Concentração de Cu.....	218
6.3.1.3. Concentração de Zn.....	222
6.3.2. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE <i>R. decussatus</i>	223
6.3.2.1. Indução de MT.....	225
6.3.3. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE METAIS	228
6.4. DISCUSSÃO.....	228

Capítulo VII **Variação da concentração de metais e metalotionina numa
população natural de amêijoas *Ruditapes decussatus***

7.1. INTRODUÇÃO.....	235
----------------------	-----

7.2. MATERIAL E MÉTODOS	239
7.2.1. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	239
7.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	240
7.3. RESULTADOS	242
7.3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS METAIS PELOS DIFERENTES TECIDOS.....	242
7.3.1.1. Variação espacial e sazonal	243
7.3.2. DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DE METAIS.....	248
7.3.3. CONCENTRAÇÃO DE MT.....	253
7.3.4. INFLUÊNCIA DO PESO	255
7.3.5. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE METAIS.....	257
7.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	260
7.4.1. VARIAÇÃO ESPACIAL E SAZONAL DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS	261
7.4.2. DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DE METAIS.....	262
7.4.3. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS DIFERENTES TECIDOS.....	264
7.4.4. INFLUÊNCIA DO PESO.....	266

Capítulo VIII

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

8.1. FACTORES QUE PODEM INFLUENCIAR OS NÍVEIS DE MT NA AMÊIJOA <i>R. decussatus</i> ...	271
8.2. RESPOSTA DA MT EM DIFERENTES TECIDOS DA AMÊIJOA <i>R. decussatus</i> EXPOSTA A Cd, Cu e Zn	273
8.3. APLICAÇÃO DA MT NUMA POPULAÇÃO NATURAL DE AMÊIJOAS <i>R. decussatus</i> NA RIA FORMOSA.....	280
8.4. CONCLUSÕES.....	282

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	283
---------------------------------	-----

ANEXO

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1.1 – Mecanismos propostos para o fluxo de entrada de iões metálicos nas células. M - iões metálicos (Phillips, 1993).....	21
Figura 1.2 – Representação esquemática do metabolismo e toxicidade dos metais nas células eucarióticas de inveterados marinhos (adaptado de Di Giulio <i>et al.</i> (1995)).....	24
Figura 1.3 – Sequência primária de aminoácidos da MT2A de fígado de coelho. O domínio β encontra-se localizado no N-terminal da proteína e consiste nos resíduos de 1-31. O domínio α está localizado no C-terminal e consiste nos resíduos de 32-62 (adaptado de Chan <i>et al.</i> (2002)).	29
Figura 1.4 – Estrutura terciária da molécula de MT-2 de fígado de rato obtida por cristalografia de raios-X. Resíduos de 1-30 englobando o grupo $Cd_1Zn_2Cys_9$ no N-terminal do domínio β e os resíduos de 31-61 o grupo Cd_4Cys_{11} no C-terminal do domínio α (Romero-Isart & Vařák, 2002).	32
Figura 1.5 - Indução da síntese de metalotioninas pelos metais descrita por Roesijadi (1992). ERM - Elementos de Regulação Metálica; FTM - Factor de Transcrição Metálico; Li - Ligando; Me - Metal	35

Capítulo II

Figura 2.1 – Locais amostrados na Ria Formosa. A) Local directamente influenciado por fontes antrópicas; B) Local não influenciado por fontes antrópicas.....	53
Figura 2.2 – Esquema representativo do método laboratorial, para a extracção das diferentes fracções subcelulares (FI - fracção insolúvel; FS - fracção solúvel; FEPM - fracção proteica de elevado peso molecular; FBPM - fracção proteica de baixo peso molecular). (EAA - Espectrofotometria de Absorção Atómica; PDI - Polarografia Diferencial com Impulsos).....	55
Figura 2.3 – Concentração de metalotionina (MT) na glândula digestiva de machos e fêmeas de <i>Ruditapes decussatus</i> , durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) nos locais A e B da Ria Formosa (■ Machos; □ Fêmeas). (Os dados representam média $\pm \sigma$ para n=6 e os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$))......	56
Figura 2.4 – Concentração total de Cd, Cu e Zn na glândula digestiva de machos e fêmeas de <i>Ruditapes decussatus</i> , durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) nos locais A e B da Ria Formosa: (A _I) Cd total no local A; (B _I) Cd total no local B; (A _{II}) Cu total no local A; (B _{II}) Cu total no local B; (A _{III}) Zn total no local A; (B _{III}) Zn total no local B. (■ Machos; □ Fêmeas). (Os dados representam média $\pm \sigma$ para n=6 e os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$))......	58

Figura 2.5 – Soma da concentração de Cd, Cu e Zn (TMe) (Total e FBPM) na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus*, durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) nos locais A e B da Ria Formosa: (A_I) TMe total no local A; (B_I) TMe total no local B; (A_{II}) TMe na FBPM no local A; (B_{II}) TMe na FBPM no local B. (■ Machos; □ Fêmeas).
(Os dados representam média $\pm \sigma$ para n-6 e os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0.05$)). 63

Figura 2.6 – Relação entre a concentração de MT e a Soma molar da concentração de Cd, Cu e Zn (TMe) na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus*, durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) na Ria Formosa: (a) Total; (b) FBPM. 64

Figura 2.7 – Relação entre a concentração de MT e a concentração de cada metal (Cd, Cu e Zn) na fracção subcelular FBPM da glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus*, durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) na Ria Formosa: (a) Cd; (b) Cu; (c) Zn. 66

Capítulo III

Figura 3.1 – Concentração (nmol g⁻¹) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a 4 µg l⁻¹ (I) e a 40 µg l⁻¹ (II) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM). 84

Figura 3.2 – Concentração (nmol g⁻¹) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) na glândula digestiva das amêijoas expostas a 4 µg l⁻¹ (I) e a 40 µg l⁻¹ (II) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM). 85

Figura 3.3 – Concentração (nmol g⁻¹) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) na restante parte edível das amêijoas expostas a 4 µg l⁻¹ (I) e a 40 µg l⁻¹ (II) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM). 87

Figura 3.4 – Concentrações de Cd (média $\pm \sigma$) (total e fracções subcelulares) experimentais e evolução prevista no modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias das amêijoas expostas a 40 µg l⁻¹, durante 40 dias. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM). 89

Figura 3.5 – Concentrações de Cd (média $\pm \sigma$) (total e nas fracções subcelulares) experimentais e evolução prevista no modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias (A) e glândula digestiva (B) das amêijoas pré-expostas a 40 µg l⁻¹ ao longo de 50 dias de depuração. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM). 93

Figura 3.6 – Concentração (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), das amêijoas não contaminadas e expostas a 4 µg l⁻¹ e a 40 µg l⁻¹ durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração (○ controlo; □ 4 µg l⁻¹; ■ 40 µg l⁻¹). 95

Figura 3.7 – Relação entre as concentrações de MT e Cd nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), durante os períodos de acumulação (I) e de eliminação (II). Total (●) e fracção FBPM (○). 98

Capítulo IV

- Figura 4.1** - Esquema do procedimento laboratorial utilizado na separação cromatográfica. 120
- Figura 4.2** - Evolução da percentagem da mortalidade acumulada de indivíduos ao longo do tempo, quando contaminados com diferentes concentrações de cobre (símbolos - pontos observados; linhas a cheio - curvas estimadas). 121
- Figura 4.3** - Curva de toxicidade do Cu para a espécie *R. decussatus*. 122
- Figura 4.4** - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 40 dias e 50 dias de depuração (I) e expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 25 dias (II). (■ Total; Δ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM). 125
- Figura 4.5** - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM das brânquias das amêijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias; B) não contaminadas e contaminadas com $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 e 40 dias. (▲ fração onde eluiu a MT). 127
- Figura 4.6** - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM da glândula digestiva das amêijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias; B) não contaminadas e contaminadas com $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 e 40 dias. (▲ fração onde eluiu a MT). 129
- Figura 4.7** - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias; B) não contaminadas e contaminadas com $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 e 40 dias. (▲ fração onde eluiu a MT). 131
- Figura 4.8** - Concentrações de Cu (média $\pm \sigma$) (total e nas diferentes frações subcelulares) experimentais e evolução prevista no modelo cinético de 1º ordem, nas brânquias (A) glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 25 dias. (■ Total; Δ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM). 133
- Figura 4.9** - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM das brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas não contaminadas e contaminadas com $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 40 dias e depuradas durante 50 dias. (▲ fração onde eluiu a MT). 136
- Figura 4.10** - Concentrações de Cu (média $\pm \sigma$) (total e nas frações subcelulares) experimentais e evolução prevista pelo modelo cinético de 1º ordem, nas brânquias (A) glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ durante de 50 dias de depuração. (■ Total; Δ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM). 138
- Figura 4.11** - Concentração (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), das amêijoas não contaminadas, expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 40 dias seguidas de 50 dias de depuração e expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 25 dias. (○ controlo; □ $25 \mu\text{g l}^{-1}$; ■ $50 \mu\text{g l}^{-1}$). 140

Figura 4.12 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM das brânquias das amêijoas: **A)** não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias de exposição; **B)** não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ após 14 e 40 dias de exposição. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT)..... 142

Figura 4.13 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM da glândula digestiva das amêijoas: **A)** não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias de exposição; **B)** não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ após 14 e 40 dias de exposição. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT)..... 144

Figura 4.14 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas: **A)** não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias de exposição; **B)** não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ após 14 e 40 dias de exposição. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT)..... 146

Figura 4.15 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM das brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT)..... 148

Figura 4.16 - Relação entre as concentrações de MT e Cu nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), durante os períodos de acumulação (I) e de eliminação (II). Total (\bullet) e fração FBPM (\circ)..... 151

Capítulo V

Figura 5.1 - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (A_I) e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (A_{II}), durante 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\blacksquare Total; \triangle FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 170

Figura 5.2 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Zn na fração FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas e das expostas a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ ao fim de 7 e 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT)..... 172

Figura 5.3 - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) na glândula digestiva das amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (A_I) e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (A_{II}), durante 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\blacksquare Total; \triangle FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 173

Figura 5.4 - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) na restante parte edível das amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (A_I) e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (A_{II}), durante 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\blacksquare Total; \triangle FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 174

Figura 5.5 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Zn na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas não contaminadas e das expostas a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ ao fim 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT)..... 175

Figura 5.6 - Concentração (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), das amêijoas não contaminadas e expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias. (\circ controle; \square 100 $\mu\text{g l}^{-1}$; \blacksquare 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$)..... 181

Figura 5.7 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas e das expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ao fim de 7 e 40 dias e depuradas durante 50 dias (\blacktriangle fração onde eluiu a MT) 182

Figura 5.8 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas: não contaminadas, contaminadas com $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ ao fim de 40 dias e depuradas durante 50 dias (\blacktriangle fração onde eluiu a MT) 183

Figura 5.9 - Relação entre as concentrações de MT e Zn nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), durante os períodos de acumulação (I) e de eliminação (II). Total (\bullet) e fração FBPM (\circ)..... 186

Capítulo VI

Figura 6.1 - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cd total e nas diferentes frações subcelulares nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias. (\blacksquare Total; Δ FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 208

Figura 6.2 - Concentração de Cd (média $\pm \sigma$) total e nas diferentes frações subcelulares e evolução prevista pelo modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias (A) e na glândula digestiva (B) das amêijoas expostas a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, durante 25 dias. (\blacksquare Total; Δ FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 210

Figura 6.3 - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cu total e nas diferentes frações subcelulares nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica de $100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, durante 25 dias. (\blacksquare Total; Δ FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 213

Figura 6.4 - Concentração de Cu (média $\pm \sigma$) total e nas diferentes frações subcelulares observada e prevista pelo modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias (A) glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$), durante 25 dias. (\blacksquare Total; Δ FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 216

Figura 6.5 - Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn total e nas diferentes frações subcelulares nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias de exposição. (\blacksquare Total; Δ FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM)..... 220

Figura 6.6 - Concentração (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias de exposição. (\circ controlo; \bullet exposição)..... 224

Figura 6.7 - Relação entre a concentração de MT e a concentração de metal no total e na fração subcelular de baixo peso molecular (FBPM) nos diferentes tecidos da amêijoas: (a_T) Cd total; (a_{FB}) Cd FBPM; (b_T) Cu total; (b_{FB}) Cu FBPM; (c_T) Zn total; (c_{FB}) Zn FBPM. (\bullet) B - brânquias; (\circ) GD - glândula digestiva; (\blacktriangle) R - restante parte edível 226

Capítulo VII

Figura 7.1 – Locais amostrados na Ria Formosa. 1) Faro; 2) Olhão; 3) Tavira; 4) Marim; 5) Ramalhete; 6) Torre d'Aires; 7) Farol; 8) Culatra; 9) Armona	239
Figura 7.2 – Análise de componentes principais (PCA), em função da concentração de metais e de MT na amêijoia <i>R. decussatus</i>	242
Figura 7.3 – Variação sazonal da concentração de Cd (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A (A), B (B) e C (C) da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)). (□ Brânquias ■ Gl. Digestiva □ Resto)	245
Figura 7.4 – Variação sazonal da concentração de Cu (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A (A), B (B) e C (C) da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)). (□ Brânquias ■ Gl. Digestiva □ Resto)	246
Figura 7.5 – Variação sazonal da concentração de Zn (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A (A), B (B) e C (C) da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)). (□ Brânquias ■ Gl. Digestiva □ Resto)	247
Figura 7.6 – Variação sazonal da concentração de MT (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A, B e C da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)). (□ Brânquias ■ Gl. Digestiva □ Resto)	254
Figura 7.7 – Relação entre a concentração de Cd, Cu, Zn e MT e o índice de condição (IC) nos diferentes tecidos da amêijoia: (A) brânquias; (B) glândula digestiva; (C) restante parte edível. (▲ Zn; x MT; ♦ Cd; o Cu)	256
Figura 7.8 – Relação entre a concentração de MT e a concentração de Cd e Cu no total e na fracção subcelular de baixo peso molecular (FBPM) nos diferentes tecidos da amêijoia: (a _T) Cd total; (a _{FBPM}) Cd FBPM; (b _T) Cu total; (b _{FBPM}) Cu FBPM. (●) B - brânquias; (◇) GD - glândula digestiva; (▲) R - restante parte edível	258

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.1 – Critérios de qualidade da água marinha estabelecidos pela EPA (1992, 1998) e concentrações de risco (CR) para o consumo de produtos pesqueiros (EPA, 2000), baseado no consumo de 54 g d ⁻¹ de peixe durante 75 dias ano ⁻¹ (adaptado Neff, 2002).....	6
Tabela 1.2 – Fontes de Cd no meio ambiente (adaptado de Clark, 2001).....	8
Tabela 1.3 – Efeitos tóxicos de Cd em diferentes espécies de invertebrados marinhos.....	9
Tabela 1.4 – Fontes de Cu no meio ambiente (adaptado de Baruthio, 1991; Clark, 2001).....	10
Tabela 1.5 – Efeitos tóxicos de Cu em diferentes espécies de invertebrados marinhos.....	12
Tabela 1.6 – Fontes de Zn no meio ambiente (adaptado de Baruthio, 1991; Jurkiewicz <i>et al.</i> , 2001; Dorronsoro <i>et al.</i> , 2002).....	14
Tabela 1.7 – Efeitos tóxicos de Zn em diferentes espécies de invertebrados marinhos.....	15
Tabela 1.8 - Influência da salinidade na acumulação de metais em diferentes organismos.....	16
Tabela 1.9 - Exemplos de fenómenos de interações metálicas (sinergismo ou antagonismo) em diferentes espécies de bivalves expostas a uma contaminação polimetálica.....	18
Tabela 1.10 - Percentagem de metais na fracção citosólica de diferentes espécies de invertebrados marinhos (FC - fracção citosólica).....	26
Tabela 1.11 - Características das MTs (adaptado de Nordberg (1998)).....	28
Tabela 1.12 - Sequência de aminoácidos em MTs de mamíferos e em invertebrados.....	31
Tabela 1.13 - Critério de classificação de metalotioninas segundo Fowler <i>et al.</i> (1987).....	33
Tabela 1.14 - Função das MTs (adaptado de Nordberg (1998) e Chan <i>et al.</i> (2002)).....	36
Tabela 1.15 - Concentração de MT em diferentes tecidos de moluscos bivalves.....	39
Tabela 1.16 - Espécies de moluscos onde a MT foi proposta como biomarcador de exposição metálica.....	40

Capítulo II

Tabela 2.1 - Concentração de Cd, Cu e Zn (nmol g ⁻¹ tecido seco) na glândula digestiva da amêijoia <i>Ruditapes decussatus</i> nos locais A e B da Ria Formosa (média ± σ, n=6).....	57
Tabela 2.2 - Relação entre a concentração de MT e a concentração de metais (total e FBPM) na glândula digestiva da amêijoia <i>Ruditapes decussatus</i>	65

Capítulo III

Tabela 3.1 - Concentração de Cd (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a 4 e 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, ao fim de 40 dias de exposição e de 50 de depuração.....	82
Tabela 3.2 - Ajuste exponencial aos dados de acumulação de Cd na glândula digestiva das amêijoas expostas a 4 e 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, durante 40 dias.....	86
Tabela 3.3 - Factor de bioconcentração (FBC), taxa constante de assimilação (K_a) e taxa constante de depuração (K_d) nas brânquias (total e frações subcelulares) das amêijoas expostas a 4 e 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, durante 40 dias.....	89
Tabela 3.4 - Concentração inicial de Cd (C_i), taxa constante de eliminação (K_e) e tempo de meia-vida $t_{1/2}$ (no total e nas frações subcelulares) das brânquias e da glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cd e depuradas durante 50 dias.....	93
Tabela 3.5 - Razão molar MT:Cd na fração FBPM em diferentes tecidos das amêijoas expostas durante 40 dias a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cd e depuradas durante 50 dias.....	99
Tabela 3.6 - Incremento na indução de MT em diferentes tecidos de <i>R. decussatus</i> expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição.....	103

Capítulo IV

Tabela 4.1 - Determinação do volume morto (V_m) e o volume da fase estacionária (V_n) e calibração da coluna.....	118
Tabela 4.2 - Tempo de sobrevivência média (LT_{50}) da espécie <i>R. decussatus</i> , para as concentrações testadas	122
Tabela 4.3 - Concentração de Cu (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes frações subcelulares) em diferentes tecidos das amêijoas não contaminada e das expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu ao fim 40 dias de exposição e de 50 dias de depuração e ainda das amêijoas expostas a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu ao fim de 25 dias de exposição (os valores correspondem média $\pm \sigma$).....	123
Tabela 4.4 - Velocidade de acumulação de Cu ($\text{nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (total e nas diferentes frações subcelulares) em diferentes tecidos das amêijoas contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 40 dias e com 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 25 dias. ($p < 0,05$).....	124
Tabela 4.5 - Factor de bioconcentração (FBC- K_a/K_d), taxa constante de assimilação (K_a) e taxa constante de depuração (K_d) nos diferentes tecidos (total e frações subcelulares) das amêijoas expostas a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu durante 25 dias.....	132
Tabela 4.6 - Equações exponenciais de eliminação de Cu nos diferentes tecidos (total e frações subcelulares) das amêijoas pré-expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu.....	134
Tabela 4.7 - Concentração inicial de Cu (C_i), taxa constante de eliminação (K_e) e tempo de meia-vida $t_{1/2}$ (no total e nas frações subcelulares) dos diferentes tecidos das amêijoas pré-expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu e depuradas durante 50 dias.....	137

Tabela 4.8 - Razão molar MT:Cu na fracção FBPM em diferentes tecidos das amêijoas expostas durante 40 dias a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu e depuradas durante 50 dias e expostas durante 25 dias a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu.....	150
---	-----

Capítulo V

Tabela 5.1 - Concentração de Zn (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, ao fim de 40 dias de exposição e de 50 de depuração	169
--	-----

Tabela 5.2 - Razão molar MT:Zn na fracção FBPM em diferentes tecidos das amêijoas expostos durante 40 dias a 100 e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Zn e depuradas durante 50 dias	187
---	-----

Capítulo VI

Tabela 6.1 - Concentração de Cd (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias (os valores correspondem média $\pm \sigma$).....	205
--	-----

Tabela 6.2 - Factor de bioconcentração (FBC), taxa constante de acumulação (K_a) e taxa constante de eliminação (K_e) nas brânquias e na glândula digestiva (total e fracções subcelulares) das amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$, durante 25 dias.....	211
---	-----

Tabela 6.3 - Concentração de Cu (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias (os valores correspondem média $\pm \sigma$).....	212
--	-----

Tabela 6.4 - Factor de bioconcentração (FBC), taxa constante de acumulação (K_a) e taxa constante de eliminação (K_e) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível (total e fracções subcelulares) das amêijoas expostas a uma mistura metálica (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$), durante 25 dias.....	217
--	-----

Tabela 6.5 - Concentração de Zn (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias.....	218
--	-----

Tabela 6.6 - Concentração de MT em função do metal (nmol g^{-1}) na fracção subcelular de baixo peso molecular (FBPM), nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas (n=30).....	225
---	-----

Tabela 6.7 - Razão molar MT:Metal em diferentes tecidos das amêijoas expostas a uma mistura metálica (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias	227
--	-----

Capítulo VII

Tabela 7.1 – Concentração de Cd (total e subcelular) (média $\pm \sigma$) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes zonas da Ria Formosa..... 250

Tabela 7.2 – Concentração de Cu (total e subcelular) (média $\pm \sigma$) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes zonas da Ria Formosa..... 251

Tabela 7.3 – Concentração de Zn (total e subcelular) (média $\pm \sigma$) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes zonas da Ria Formosa..... 252

Tabela 7.4 – Variação da concentração de MT em função do metal (total e fracção FBPM) (nmol g⁻¹) e do peso (g), nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas na Ria Formosa..... 259

Capítulo VIII

Tabela 8.1 – Comparação entre a acumulação de Cd, Cu e Zn nos diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus* exposta a concentrações individuais de cada metal: concentrações mais baixas (4 µg Cd l⁻¹, 25 µg Cu l⁻¹ e 100 µg Zn l⁻¹), concentrações mais elevadas (40 µg Cd l⁻¹, 50 µg Cu l⁻¹ e 1000 µg Zn l⁻¹) e à mistura metálica destes metais (100 µg Cd l⁻¹ + 50 µg Cu l⁻¹ + 50 µg Zn l⁻¹)..... 275

Tabela 8.2 – Comparação entre os tempos de meia vida (t_{1/2}) de cada metal e de MT durante o período de depuração de 50 dias, nos diferentes tecidos das amêijoas..... 279

Anexos

Tabela A.1 – Concentração (nmol g⁻¹) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas durante 90 dias.

(Total – tecido total; FI – fracção subcelular insolúvel; FEPM – fracção subcelular de elevado peso molecular; FBPM – fracção subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.2 – Concentração (nmol g⁻¹) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 4 µg Cd l⁻¹ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI – fracção subcelular insolúvel; FEPM – fracção subcelular de elevado peso molecular; FBPM – fracção subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.3 – Concentração (nmol g⁻¹) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 40 µg Cd l⁻¹ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI – fracção subcelular insolúvel; FEPM – fracção subcelular de elevado peso molecular; FBPM – fracção subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.4 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas durante 90 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.5 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 25 µg Cu l⁻¹ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.6 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 50 µg Cu l⁻¹ durante 25 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.7 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas durante 90 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.8 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 100 µg Zn l⁻¹ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.9 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 1000 µg Zn l⁻¹ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.10 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cd (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a uma mistura metálica (100 µg Cd l⁻¹ + 50 µg Cu l⁻¹ + 100 µg Zn l⁻¹) durante 25 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.11 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a uma mistura metálica (100 µg Cd l⁻¹ + 50 µg Cu l⁻¹ + 100 µg Zn l⁻¹) durante 25 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.12 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a uma mistura metálica (100 µg Cd l⁻¹ + 50 µg Cu l⁻¹ + 100 µg Zn l⁻¹) durante 25 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tabela A.13 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas e expostas a Cd (4 e 40 $\mu\text{g l}^{-1}$) e Zn (100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$) durante 40 dias e depuradas durante 50 dias e expostas a Cu (25 e 50 $\mu\text{g l}^{-1}$) e a uma mistura metálica (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 100 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias.

SÍMBOLOS, ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ABS	Albumina do Soro Bovino
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ApoMT	Apometalotionina (metalotionina sem metal)
ARN	Ácido Ribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
Cd-MT	Metalotionina contendo cádmio
CR	Concentrações de Risco
Cu-MT	Metalotionina contendo cobre
Da	Daltons
DPI	Polarografia Diferencial com Impulsos
DTT	Ditiotreitol
EAA	Espectrofotometria de Absorção Atômica
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPA	Environmental Protection Agency (Agência Americana de Proteção do Ambiente)
ERM	Elementos de Regulação Metálica
FBPM	Fracção de Baixo Peso Molecular (fracção subcelular)
FEPM	Fracção de Elevado Peso Molecular (fracção subcelular)
FI	Fracção Insolúvel (fracção subcelular)
FTM	Factor de Transcrição Metálico
Mr	Massa Molecular Relativa
MT	Metalotionina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TMe	Concentração total dos metais
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultra-violeta
Zn-MT	Metalotionina contendo zinco

Capítulo I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. METAIS NO MEIO AQUÁTICO

1.2. METALOTIONINA

1.3. OBJECTIVO DA TESE

1. INTRODUÇÃO GERAL

O interesse pelo estudo do comportamento dos metais no meio aquático foi despertado na comunidade científica a partir da revolução industrial, quando a utilização destes elementos e dos seus compostos, assim como a sua rejeição para o meio ambiente teve um enorme incremento e o qual ainda hoje não cessou.

Entre as substâncias químicas, cuja ocorrência e acumulação no ambiente em concentrações acima de um determinado nível é preocupante, destacam-se os metais. Os metais são reconhecidos como os contaminantes com maior potencial na indução de efeitos biológicos adversos (Martin & Richardson, 1991). Estes efeitos derivam da sua persistência, toxicidade e do seu notável grau de acumulação ao longo da cadeia trófica, podendo em último grau atingir o Homem (Hernández-Hernández *et al.*, 1990).

As zonas onde geralmente aparece este tipo de contaminação são áreas com implantação industrial e com elevado desenvolvimento agrícola. As zonas costeiras, incluindo os sistemas lagunares costeiros, são particularmente afectadas, uma vez que de um modo geral oferecem boas condições para implantações industriais e localização de centros urbanos importantes.

A análise de moluscos bivalves tem sido utilizada para obter informações da potencial contaminação e dispersão de metais nestas áreas. Estes organismos são denominados bioindicadores, e correspondem a espécies e/ou grupo de espécies que pela sua presença e/ou abundância são significativas das propriedades do ecossistema onde estão inseridas (Guelorget & Perthuisot, 1984). No entanto, a utilização de bioindicadores para estimar e seguir o estado de "saúde" ambiental não permite prevenir precocemente uma situação de contaminação (Lagadic *et al.*, 1997). Na tentativa de detectar os primeiros riscos de contaminação, vários investigadores têm orientado os seus estudos na função de moléculas sintetizadas normalmente em taxas variáveis ou excepcionalmente presentes nas células dos organismos na presença de contaminantes. Estas moléculas são denominadas genericamente por biomarcadores, e são definidas por Lagadic *et al.* (1997) como sendo "uma mudança observável e/ou medida ao nível molecular, bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental, que

revela uma exposição presente ou passada de um indivíduo a uma substância química com características poluentes”.

Existem diferentes tipos de biomarcadores consoante a sua especificidade relativa à sua resposta aos diferentes tipos de contaminantes. Contrariamente a outros biomarcadores (histológicos, imunológicos ou fisiológicos) que não reflectem a presença de um contaminante em particular, a metalotionina (MT) mostra uma certa especificidade relativamente à contaminação metálica. Por esta razão, numerosos estudos sugerem a determinação dos níveis de MT em esquemas de monitorização ambiental com o objectivo de prever, a nível molecular, alterações bioquímicas causadas por metais antes que efeitos toxicológicos adversos possam ocorrer (Langston *et al.*, 1998; Cosson, 2000; Isani *et al.*, 2000).

1.1. METAIS NO MEIO AQUÁTICO

As fontes dos metais que entram no meio aquático podem ser tanto de origem natural como antrópicas. Os processos naturais como a erosão e lixiviação química dos solos e rochas das bacias hidrográficas (materiais litogénicos) constituem a fonte mais importante dos níveis de base dos metais. Os detritos de organismos e os produtos de decomposição da matéria orgânica (materiais biogénicos) também contribuem, embora em menor escala, para a quantidade de metais de origem natural (Clark, 2001). No entanto, presentemente a quantidade de metais provenientes de fontes antrópicas de certos metais pesados no meio aquático iguala ou excede a quantidade libertada por processos naturais. Destaca-se entre outras, (i) a exploração e processamento de minérios, os quais podem causar a dispersão e deposição de grandes quantidades de metais vestigiais, (ii) os efluentes domésticos e industriais, (iii) os metais lançados para a atmosfera, provenientes da queima de combustíveis fósseis que ao serem arrastados pela chuva entram no ciclo da água, (iv) a lixiviação das bacias hidrográficas que arrasta produtos utilizados na agricultura que frequentemente contêm grandes quantidades de metais (Neff, 2002).

Nas águas naturais os metais podem estar presentes sob formas físico-químicas muito variadas na fase solúvel e particulada. A especiação química destes elementos no

meio aquático depende dos factores físico-químicos do ambiente considerado. Estes factores, tais como a salinidade, o pH, a turbidez, a concentração em matéria orgânica, bem como as propriedades inerentes a cada metal, determinam a forma química dos metais nos sistemas aquáticos (Clark, 2001).

Na fase solúvel, os metais podem estar presentes sob a forma de iões hidratados, de complexos orgânicos e inorgânicos, bem como associados à fase coloidal. Ao nível da fase particulada, os metais encontram-se adsorvidos ou incorporados na matriz mineral detritica (Morrison, 1989).

1.1.1. TOXICIDADE DOS METAIS

Os elementos metálicos encontrados no ambiente podem ser classificados em duas categorias, segundo o seu carácter essencial ou não-essencial. Um metal é considerado como essencial quando responde a dois critérios: (i) a ausência ou carência do elemento altera os processos vitais; (ii) a alteração desses processos vitais pode ser prevenida pela conservação ou adição, segundo as necessidades fisiológicas do metal considerado. Seguindo esses critérios, dezassete metais são considerados essenciais, donde quatro (Na, K, Ca e Mg) estão presentes em grande quantidade, enquanto os outros treze (As, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V e Zn) estão presentes em estado vestigiário ($0,001$ a 1 mmol Kg^{-1} de peso fresco) ou ultra-vestigiário ($<1 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$ de peso fresco) (Mason & Jenkins, 1995).

A outra categoria agrupa os metais não-essenciais, para os quais nenhuma função biológica é actualmente conhecida (Hg, Ag, Cd e Pb). Estes elementos são considerados tóxicos mesmo em baixas concentrações (Mason & Jenkins, 1995).

A toxicidade dos metais pode ser definida como uma disfunção biológica causada pela captura de um elemento metálico (Mason & Jenkins, 1995). A maior parte dos dados sobre a toxicidade de metais foi obtido em condições laboratoriais controladas, com o objectivo de estabelecer o efeito do metal sem procurar estudar o mecanismo correspondente à origem da resposta biológica. É geralmente admitido que os metais exercem a sua actividade tóxica de forma não específica. As diferentes acções tóxicas podem ter lugar através do bloqueio de grupos funcionais essenciais nas moléculas

I

biológicas e/ou da modificação da conformação dessas moléculas (Mason & Jenkins, 1995). Por exemplo, o Cd pode agir sobre diferentes moléculas tais como pequenos polipeptídeos como a glutatona ou metaloenzimas à base de Zn (por exemplo a fosfatase alcalina e a carboxipeptidase) (Giguère et al., 2003). Este metal pode também apresentar uma acção ao nível das permeases, no entanto, estas moléculas podem também ser inibidas na presença de Cu, Zn ou Pb, pelo que nenhuma destas moléculas são específicas a um metal assim como um metal não é específico a este tipo de moléculas (Mason & Jenkins, 1995). Este tipo de ligação não específica constitui a forma principal de toxicidade dos metais.

Nos últimos anos tem-se dado particular importância ao estudo do comportamento de catiões metálicos no meio aquático, tal como o Cd, Cu e Zn. Estes metais encontram-se referidos em listas estabelecidas a nível europeu para assegurar uma protecção eficaz do meio aquático. Deste modo, estabeleceram-se duas listas relativas à poluição causada por determinadas substâncias perigosas lançadas no meio aquático. A Lista I inclui determinadas substâncias cuja escolha se baseia principalmente na sua toxicidade, persistência e bioacumulação, na qual se inclui o Cd. A Lista II inclui substâncias que têm um efeito prejudicial no meio aquático, efeito esse que pode, todavia, ser limitado a uma determinada zona que depende das características das águas receptoras e da sua localização. Neste caso, qualquer descarga dessas substâncias deve estar submetida a autorização prévia após fixadas as normas de emissão. Nesta lista encontram-se o Cu e Zn (Directiva do Conselho n.º 76/464/CEE). A Agência Americana de Protecção do Ambiente (EPA), para além dos critérios acima referidos, também estabeleceu critérios de qualidade para a água do mar e concentrações de risco (CR) para o consumo de produtos pesqueiros, relativamente a estes metais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Critérios de qualidade para a água do mar estabelecidos pela EPA (1992, 1998) e concentrações de risco (CR) para o consumo de produtos pesqueiros (EPA, 2000), baseado no consumo de 54 g d⁻¹ de peixe durante 75 dias ano⁻¹ (adaptado Neff (2002)).

Metal	Critérios Agudos ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Critérios Crónicos ($\mu\text{g l}^{-1}$)	CR ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
Cd	42	9,3	13,5
Cu	4,8	3,1	540
Zn	90	81	4055

1.1.2. CÁDMIO

1.1.2.1. Ocorrência

O Cd é um elemento relativamente raro mas largamente distribuído na crosta terrestre (Clark, 2001). O nível de Cd nos solos varia aproximadamente entre 0,01 e 1,8 ppm (EPA 2001). Na água doce, o Cd pode ocorrer a concentrações inferiores a 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Allen, 1994), mas em ambientes costeiros com influência antrópica, as concentrações podem chegar a 42 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Langston, 1990). No meio marinho, o Cd encontra-se principalmente na forma dissolvida (Phillips & Rainbow, 1993) e apresenta-se maioritariamente sob as formas de complexos clorados (CdCl_2 , CdCl_3^- e CdCl^+) (Clark, 2001).

O Cd é relativamente móvel no ambiente marinho, devido à sua especiação, tendência para não se ligar fortemente a partículas e à sua capacidade de formar sulfuretos solúveis em condições redutoras. Grande parte do Cd existente em águas estuárias e marinhas é transferível e potencialmente biodisponível. No entanto, o Cd iónico (Cd^{2+}), que geralmente representa uma pequena fracção do Cd dissolvido na água do mar, é a espécie mais biodisponível (Neff, 2002).

A partir de 1950 a utilização do Cd intensificou-se com a sua inclusão em estabilizadores e pigmentos plásticos, electrodeposição, soldaduras e outras ligas metálicas (Clark, 2001). O Cd é igualmente utilizado em centrais nucleares como componente das barras de grafite utilizadas no controlo do processo de fissão, e na indústria electrónica (telas de televisão, células foto voltaicas e dispositivos de detecção de radiação) (Tricot, 1989). A crescente preocupação relativamente aos efeitos do Cd na saúde humana, têm feito diminuir a sua utilização para estes fins, mas o impacto destas medidas não têm reduzido os níveis deste metal, uma vez que tem havido um aumento da utilização de Cd em baterias de Ni-Cd, e a produção mundial têm-se mantido relativamente constante em cerca de 19500 t ano⁻¹ (Clark, 2001).

1.1.2.2. Fontes

A quantidade de Cd libertada no ambiente não pode ser rigorosamente quantificada uma vez que provém de uma grande variedade de fontes difusas (Tabela 1.2).

A quantidade de Cd que é introduzida nos oceanos está estimada em aproximadamente 8000 t ano⁻¹, das quais cerca de metade são resultantes de actividades humanas, sendo as restantes de origem natural. Aproximadamente 2900 t ano⁻¹ de Cd são depositadas nos sedimentos, a maioria das quais na plataforma continental (Clark, 2001).

Tabela 1.2 – Fontes de Cd no meio ambiente (adaptado de Clark (2001)).

-
1. Fumo, poeiras e águas residuais provenientes da exploração mineira e refinarias de chumbo e zinco, assim como da produção de Cd.
 2. Água de lavagem no processo de electrodeposição (100 a 500 ppm de Cd).
 3. Fumos, poeiras, águas residuais e lamas provenientes das indústrias de exploração de ferro, aço e metais não ferrosos.
 4. Corrosão dos revestimentos galvanizados contendo Zn (que possuem 0,2% de Cd como impureza).
 5. Desgaste dos pneus dos automóveis que contêm entre 20 a 90 ppm de Cd como impurezas do óxido de zinco usado como revestimento.
 6. Fertilizantes fosfatados (\approx 100 ppm de Cd).
 7. Combustão de carvão e petróleo (0,25 a 5,0 ppm de Cd).
 8. Lamas de esgotos (\approx 30 ppm de Cd).
-

1.1.2.3. Toxicidade

O Cd na sua forma biodisponível é um dos metais mais tóxicos para plantas e animais, uma vez que, induz nestes seres vivos anomalias genéticas, fenómenos de esterilização e de carcinogénese (Degraeve, 1981; Eisler, 1985). No Homem, a exposição crónica ao Cd provoca disfunções tubulares renais que podem progredir para danos renais mais generalizados e doenças ósseas se a exposição for elevada e prolongada (Elinder & Jarup, 1996). É ainda referido como uma das causas principais da doença Itai-Itai que afectou a população Japonesa (Wittmann, 1979), intervindo também como causador do síndrome de Franconi (Degraeve, 1981).

No que diz respeito aos invertebrados marinhos, na Tabela 1.3 encontram-se resumidos alguns dos efeitos tóxicos resultante da exposição a Cd.

Tabela 1.3 – Efeitos tóxicos de Cd em diferentes espécies de invertebrados marinhos.

Espécie	Concentração ($\mu\text{g Cd l}^{-1}$)	Tempo de exposição (dias)	Efeitos	Referência
Algas				
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100000 10000		Paragem da respiração Inibição do crescimento	Taylor, 1981a "
Hidrários				
<i>Laomedea flexuosa</i>	110-280	11	Inibição do crescimento	Stebbing, 1976
Moluscos				
<i>Crassostrea gigas</i>	1000		Paragem do desenvolvimento dos embriões	Taylor, 1981a
	2000	2	LC ₅₀ nas larvas	"
	611	2	Embriogénese anormal	Martin <i>et al.</i> , 1981
			LC ₅₀ e inibição de crescimento em indivíduos com 16 dias	His <i>et al.</i> , 1999a
	>100	4	LC ₅₀ e inibição de crescimento em indivíduos com 6 dias	"
	75-85	4	Diminuição do recrutamento em indivíduos com 16 dias	"
	20-25	6	Embriogénese anormal	"
	500-1000	1-3	LC ₅₀ em indivíduos de 3 dias	"
	75	4	Inibição de crescimento em indivíduos de 3 dias	"
	40	4	LC ₅₀ e inibição do crescimento em indivíduos de 13 dias	"
<i>Crassostrea margaritacea</i>	>100	4	LC ₅₀ em indivíduos com 48 horas	"
			Afecta a taxa de filtração	Kraak <i>et al.</i> , 1992
			Embriogénese anormal	Ringwood, 1992
<i>Dreissena polymorpha</i>	9	77	Alteração das células digestivas	Vega <i>et al.</i> , 1989
<i>Isognomon californicum</i>	> 100	2	LC ₅₀	Taylor, 1981a
<i>Littorina littorea</i>	1250		LC ₁₀₀	Taylor, 1981a
<i>Mytilus edulis</i>	20000	4	Embriogénese anormal	Martin <i>et al.</i> , 1981
	5000	15		Sunila & Lindstrom, 1985
	1200	2	Deformações na concha	Kluytmans <i>et al.</i> , 1988
	> 0,1	365	Inibição folicular em ambos os sexos	Everaarts, 1990
	0,1	168	Acumulação irreversível	Pavicic <i>et al.</i> , 1994a
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	> 4000	2	Redução de amebócitos	George <i>et al.</i> , 1983
<i>Ostrea edulis</i>	100	110		
Crustáceos				
<i>Balanus amphitrite</i>	100	6	Inibição do recrutamento	Wu <i>et al.</i> , 1997

1.1.3. COBRE

1.1.3.1. Ocorrência

O Cu está largamente distribuído na crosta terrestre sendo particularmente comum encontrá-lo combinado com Fe, C e O. Em água naturais, o Cu ocorre principalmente na forma solúvel, em concentrações que variam entre 0,05 e 0,35 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Neff, 2002), podendo ultrapassar 11 mg l^{-1} (Bishop, 1983). Os sedimentos em ambientes costeiros e estuarinos contaminados contêm mais que 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cu (Neff, 2002). No meio marinho, o Cu encontra-se principalmente na forma de CuCO_3 , ou em águas com baixa salinidade na forma de CuOH^+ , podendo também formar complexos com moléculas orgânicas (Clark, 2001).

O Cu tem numerosas aplicações, nomeadamente como agente catalisador, agente oxidante em corantes na indústria têxtil, fungicida, insecticida, algicida, pesticida, como aditivo de solos, nas tintas para conservação da madeira e branqueador na indústria petrolífera (Baruthio, 1991), estimando-se uma produção de cerca de 7,5 milhões t ano^{-1} deste metal (Clark, 2001). A vasta aplicação dos compostos de Cu tem vindo a contribuir para um aumento dos níveis deste metal no meio marinho (Neff, 2002).

1.1.3.2. Fontes

Estima-se que as fontes naturais de Cu no meio marinho sejam de 325000 t ano^{-1} resultante da erosão de rochas minerais. As fontes de origem antrópica são bastante localizados e variam grandemente com a sua natureza (Tabela 1.4) (Clark, 2001).

Tabela 1.4 – Fontes de Cu no meio ambiente (adaptado de Baruthio (1991) e Clark (2001)).

- | | |
|----|--|
| 1. | Escorrências da exploração mineira e refinarias de cobre e zinco |
| 2. | Corrosão de equipamentos eléctricos e amalgamas metálicas |
| 3. | Corrosão de tintas antivegetativas nos cascos de navios |
| 4. | Lamas e esgotos industriais e urbanos |
| 5. | Escorrências agrícolas |

1.1.3.3. Toxicidade

O Cu é um micronutriente essencial para plantas e animais (Neff, 2002). A actividade de Cu no metabolismo vegetal manifesta-se principalmente na síntese da clorofila e na actividade de algumas enzimas. A carência deste metal provoca deficiências fotossintéticas e incapacidade de produção de sementes. Este elemento desempenha igualmente um papel importante no metabolismo animal. Existem numerosas enzimas que possuem Cu na sua constituição, como por exemplo: a dopamina- β -hidroxilase do cérebro; a superóxido dismutase dos eritrócitos, do fígado e do cérebro; o citocromo C oxidase; a ceruloplasmina e as metaloproteínas que sem terem uma função enzimática têm um papel muito importante no metabolismo do Cu (Houot & Tarallo, 1991). A carência de Cu no metabolismo animal pode provocar anemia, diarreia e distúrbios nervosos. Por outro lado, a ingestão excessiva de compostos como o sulfato de cobre pode causar vômitos, câibras, convulsões ou mesmo a morte (Baruthio, 1991).

O Cu, apesar de ser um metal essencial, pode ser tóxico em determinadas concentrações. Na tabela 1.5 encontram-se alguns exemplos dos efeitos do Cu em invertebrados marinhos. As concentrações de Cu dissolvido utilizadas em laboratório, que causam efeitos letais ou subletais nos organismos marinhos encontram-se frequentemente na mesma gama das encontradas no meio aquático, principalmente em estuários com influência urbana (Neff, 2002). No entanto, não significa que as concentrações de Cu encontradas no meio marinho e estuarino, sejam suficientemente elevadas para provocar efeitos adversos na fauna e na flora residente desses meios, uma vez que 90% do Cu total dissolvido encontra-se complexado com ligandos orgânicos e não está biodisponível para provocar efeitos tóxicos nos organismos.

Tabela L5 – Efeitos tóxicos de Cu em diferentes espécies de invertebrados marinhos.

Espécie	Concentração ($\mu\text{g Cu l}^{-1}$)	Tempo de exposição (dias)	Efeitos	Referência
Algas				
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3000		Inibição do crescimento	Taylor, 1978
	500		Diminuição da taxa respiratória	"
	4000		Paragem da fotossíntese	"
<i>Haslea ostrearia</i>	30	5-6	Diminuição da concentração de clorofila (16%)	Joux-Arab <i>et al.</i> , 2000
Hidrários				
<i>Laomedea flexuosa</i>	10 – 13	11	Inibição do crescimento	Stebbing, 1976
<i>Hydra littoralis</i>	2 – 10		Diminuição da taxa de reprodução	Amiard-Triquet, 1989
Moluscos				
<i>Argopecten irradians</i>	2		Diminuição de sobrevivência	Nelson <i>et al.</i> , 1988
<i>Crassostrea gigas</i>	40		Afecta o desenvolvimento embrionário	Taylor, 1978
	400	4	LC ₅₀	"
	5 – 6,5	1	Embriogénese anormal	Robert & His, 1985
	>100	4	LC ₅₀ em indivíduos com 16 dias	His <i>et al.</i> , 1999a
<i>Crassostrea virginica</i>	47	1	Diminuição do crescimento	Taylor, 1978
	5	2	Embriogénese anormal	Martin <i>et al.</i> , 1981
	80	4	Aumento da peroxidação lipídica	Ringwood <i>et al.</i> , 1998
<i>Littorina littorea</i>	80	41	Alterações nas células digestivas	Soto <i>et al.</i> , 1998
<i>Macoma balthica</i>	10		Redução do tempo de vida	Amiard-Triquet, 1989
<i>Mytilus edulis</i>	200-1000		Alterações na taxa respiratória	Scott & Major, 1972
	300	7	LC ₅₀ e provocam uma para-gem da produção do biscoito	Taylor, 1978
	200	4	LC ₅₀	"
	150		Diminuição da taxa de filtração	"
	5	2	Embriogénese anormal	Martin <i>et al.</i> , 1981
	10	3	Inibição do desenvolvimento da concha	Manley, 1983
	Várias concentrações		Deformações na concha em 46 % dos indivíduos expostos	Sunila & Lindstrom, 1985
	20,8-25,6		Alteração da actividade respiratória	Redpath & Davenport, 1988
	2 - 10		Efeitos inibidores no desenvolvimento da concha	Amiard-Triquet, 1989
	2	5	Perturbações na taxa de filtração	"
	10	4	LC ₅₀ em larvas	Strömberg & Nielsen, 1991
	100 - 200	15	Diminuição do crescimento	His <i>et al.</i> , 1999b
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	40	3	Alteração do metabolismo proteico	Viarengo <i>et al.</i> , 1980; 1981
	38	2	Diminuição dos níveis de glutathione total nas brânquias e na glândula digestiva	Canesi <i>et al.</i> , 1999
<i>Ostrea edulis</i>	1 – 3	2	LC ₅₀	Amiard-Triquet, 1989
<i>Placopecten magellanicus</i>	10-20		Diminuição da reprodução	Gould <i>et al.</i> , 1988
<i>Spisula solidissima</i>	2		Diminuição de sobrevivência	Nelson <i>et al.</i> , 1988
Crustáceos				
<i>Allorchestes compressa</i>	3,7		Diminuição da população	Ahsanullah & Williams, 1991
<i>Balanus amphitrite</i>	480	1	LC ₅₀	Sasikumar <i>et al.</i> , 1995
<i>Balanus improvisus</i>	200	1	LC ₅₀	"
<i>Cancer magister</i>	49		Desenvolvimento larval anormal	Canli & Furness, 1993
<i>Elminius modestus</i>	10000	1	LC ₅₀ em larvas	Taylor, 1978
<i>Nephrops norvegicus</i>	100	14	LC ₁₀₀	"

1.1.4. ZINCO

1.1.4.1. Ocorrência

Os depósitos de Zn encontram-se largamente distribuídos na crosta terrestre, sendo muito vulgar encontrar importantes depósitos de Zn associados a elevadas quantidades de Fe (marmatite). Este elemento está amplamente distribuído no ambiente, devido a actividades naturais e antrópicas, as quais resultam no transporte de Zn através da atmosfera, solos e água (Dorronsoro *et al.*, 2002).

A concentração de Zn nos oceanos Atlântico e Pacífico varia entre 0,006 a 0,12 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Pohl *et al.*, 1993; Bruland *et al.*, 1994), tendendo a aumentar com a aproximação da costa e de estuários, nos quais são geralmente superiores a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ e ocasionalmente podem atingir 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Morse *et al.*, 1993; Law *et al.*, 1994). Elevados teores de Zn podem ser encontrados nos sedimentos perto dos locais associados à extração deste metal, podendo atingir 10000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, no entanto em ambientes costeiros e estuarinos contaminados as concentrações de Zn são mais baixas variando entre 100 a 5000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn (Neff, 2002). O Zn no meio marinho forma uma variedade de complexos inorgânicos, cuja proporção depende da salinidade e do pH do meio (Amdurer *et al.*, 1983). O Zn não complexado (Zn^{2+}) corresponde à espécie mais biodisponível e representa 17 a 46 % do Zn total dissolvido na água do mar. Os complexos ou compostos de Zn dissolvidos ou particulados quantitativamente mais importantes na água do mar a pH a 8,1 são: $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnCl^+ , ZnCl_2 e ZnCO_3 . Os complexos com S^{2-} ou HS^- e ZnS particulado também podem estar presentes em águas anóxicas (Al-Farawati & Van den Berg, 1999).

O Zn metálico é utilizado na produção de ligas ou na galvanização de estruturas de aço. Uma das ligas mais importantes de Zn é o bronze, que consiste na mistura deste elemento com o Cu. O Zn pode também ser um aditivo em certas borrachas e tintas. Este metal é também utilizado como eléctrodo nas pilhas secas. Os compostos de Zn, nomeadamente o óxido de zinco (ZnO) é utilizado na indústria cerâmica e da borracha e ainda no fabrico de tintas. O sulfato de zinco (ZnSO_4) tem aplicação na indústria têxtil e no enriquecimento de solos pobres neste elemento. O cloreto de

zinco (ZnCl_2) é usado para preservar madeiras bem como em desodorizantes fluidos (Baruthio, 1991).

1.1.4.2. Fontes

Desde os anos 1970s as emissões de Zn têm vindo a ser reduzidas substancialmente, através do controlo mais eficiente dos processos industriais, no entanto existem uma vasta variedade de fontes de Zn (Tabela 1.6), as quais contribuem com uma entrada de Zn para os oceanos de $12000 - 66000 \text{ t ano}^{-1}$ depositados através do ar (Jickkells, 1995) e adicionalmente mais 6000 t ano^{-1} de Zn dissolvido através de escoamentos fluviais.

Tabela 1.6 – Fontes de Zn no meio ambiente (adaptado de Baruthio (1991); Jurkiewicz *et al.*, (2001); Dorronsoro *et al.* (2002)).

- | | |
|----|---|
| 1. | Erupções vulcânicas, fogos florestais |
| 2. | Escoamentos da exploração mineira e refinarias de cobre e zinco |
| 3. | Corrosão de equipamentos eléctricos e amalgamas metálicas |
| 4. | Corrosão de tintas antivegetativas nos cascos de navios |
| 5. | Lamas e Esgotos industriais e urbanos |
| 6. | Escoamentos agrícolas |

1.1.4.3. Toxicidade

O Zn, tal como o Cu, é considerado um micronutriente essencial ao metabolismo dos organismos, intervindo na actividade de cerca de 300 enzimas (Vallée & Auld, 1990). A perda do Zn pode conduzir a uma inactivação da enzima quando o seu papel é catalítico ou regulador, mas quando o seu papel é estrutural, este pode ser substituído por um outro metal como o Cd sem perda de actividade. O Zn é interveniente na actividade de enzimas que participam na síntese e degradação dos ácidos nucleicos (ADN, ARN polimerase, ARNt sintetase), pelo que a sua carência induz uma diminuição da síntese proteica. O Zn é também um interveniente importante no equilíbrio ácido-base (anidrase carbónica), na síntese dos grupos heme, na desintoxicação dos radicais livres e no metabolismo dos álcoois (álcool desidrogenase) (Arnaud & Favier, 1991). Embora o Zn não seja considerado tóxico, existem certos sais deste elemento cuja ingestão provoca náuseas e diarreia. A inalação de óxido de

zinco pode provocar lesões pulmonares e, de um modo geral, em todo o sistema respiratório (Baruthio, 1991). No meio marinho e principalmente nos invertebrados marinhos, o Zn é um elemento essencial, mas pode tornar-se tóxico em concentrações elevadas (Tabela 1.7).

Tabela 1.7 – Efeitos tóxicos de Zn em diferentes espécies de invertebrados marinhos.

Espécie	Concentração ($\mu\text{g Zn l}^{-1}$)	Tempo de exposição (dias)	Efeitos	Referência
Algas				
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	90000		Paragem da fotossíntese	Taylor, 1981b
<i>Enteromorpha flexuosa</i>	1000		Mortalidade	Filho <i>et al.</i> , 1997
<i>Hypnea musciformis</i>	100		Mortalidade	"
<i>Nitzschia closterium</i>	20		Inibição de crescimento	Stauber & Florence, 1990
<i>Ulva atuca</i>	1000		Mortalidade	Filho <i>et al.</i> , 1997
Hidrários				
<i>Eirene viridula</i>	1500		Limite de toxicidade	Taylor, 1981b
<i>Laomedea flexuosa</i>	500		Inibição do crescimento	Stebbing, 1976
Moluscos				
<i>Crassostrea gigas</i>	300		Inibição do crescimento das larvas	Taylor, 1981b
	119	2	Embriogénese anormal	Martin <i>et al.</i> , 1981
	30 – 35	6	Diminuição da fixação de larvas	Amiard-Triquet, 1989
	80	4	Inibição do crescimento	His <i>et al.</i> , 1999a
	10 – 100	1 – 3	Embriogénese anormal	"
<i>Crassostrea margaritacea</i>	>100	4	LC ₅₀ em indivíduos com 3 e 13 dias	"
<i>Dreissena polymorpha</i>	382		Diminuição da taxa de filtração	Kraak <i>et al.</i> , 1994
<i>Littorina littorea</i>	80	41	Alteração das células digestiva	Soto <i>et al.</i> , 1998
<i>Mytilus edulis</i>	100000		Paragem de respiração	Taylor, 1981b
	8000	4	LC ₅₀	"
	2000		Diminuição da taxa de filtração	"
	175	2	Embriogénese anormal	Martin <i>et al.</i> , 1981
	6500 – 216000		Redução da mobilidade do esperma	Earnshaw <i>et al.</i> , 1986
	470-860		Diminuição da taxa de filtração	Redpath & Davenport, 1988
	10 – 60		Efeitos inibidores no desenvolvimento da concha	Amiard-Triquet, 1989
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>In situ</i>		Alteração das células digestiva	Etxebarria <i>et al.</i> , 1994
	145		Embriogénese anormal	Pavicic <i>et al.</i> , 1994a
Crustáceos				
<i>Allorchestes compressa</i>	100	1	Diminuição do crescimento	Ahsanullah & Williams, 1991
<i>Mysidopsis bahia</i>	166		Afecta a taxa de reprodução	Lussier <i>et al.</i> , 1985
<i>Palaeomonetes pugio</i>	11300	2	LC ₅₀	Burton & Fisher, 1990
<i>Penaeus setiferus</i>	43870	4	LC ₅₀	Vanegas <i>et al.</i> , 1997

1.1.5. FACTORES QUE INFLUENCIAM A ACUMULAÇÃO METÁLICA NOS ORGANISMOS

1.1.5.1. Factores físico-químicos

Uma mudança dos factores físico-químicos, pode alterar o equilíbrio da concentração de iões metálicos, afectando a sua biodisponibilidade e consequentemente a taxa de assimilação destes iões pelos organismos.

Um dos factores mais estudados é o efeito da salinidade. A diminuição da salinidade leva a um decréscimo dos cloro-complexos metálicos (de Cd e Zn) e por isso corresponde a um aumento da disponibilidade de iões livres. Os organismos que vivem em salinidades baixas contêm teores mais elevados de Cd, comparativamente com os organismos que habitam em ambientes com salinidades mais elevadas (Phillips, 1976; 1977a). Na Tabela 1.8 estão ilustrados alguns exemplos da influência da salinidade na acumulação de metais em diferentes organismos.

Tabela 1.8 – Influência da salinidade na acumulação de metais em diferentes organismos.

Espécie	Metais	Salinidade	Referência
Moluscos			
<i>Crassostrea gigas</i>	Aumento da incorporação de Cd e Zn	Diminuição da salinidade	Amiard-Triquet <i>et al.</i> , 1991
	Aumento da incorporação de Cd	"	Mouneyrac <i>et al.</i> , 1998; Legras <i>et al.</i> , 2000
<i>Crassostrea Virginica</i>	Aumento da incorporação de Cd e Zn	"	Frazier, 1979
	Aumento da incorporação de Cu e Zn	"	Phelps <i>et al.</i> , 1985
<i>Littorina littorea</i>	Aumento da incorporação de Cd	"	Bjerregaard & Depledge, 1994
<i>Mytilus edulis</i>	Aumento da incorporação de Cd e Zn	"	Phillips, 1977b
Crustáceos			
<i>Carcinus maenas</i>	Aumento da incorporação de Cd	Diminuição da salinidade	Legras <i>et al.</i> , 2000
<i>Orchestia gammarellus</i>	Aumento da incorporação de Cd e Zn	Salinidade <25‰	Rainbow, 1997
<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Aumento da incorporação de Cd	Diminuição da salinidade	"

A temperatura pode igualmente corresponder a um factor que influencia a acumulação de metais. O aumento da temperatura está ligado a um aumento do metabolismo e a um aumento da actividade dos organismos, levando consequentemente a um aumento da acumulação de metais. Por exemplo, na ostra *Crassostrea virginica* os níveis de Cd e Cu aumentaram com o aumento da temperatura (Abbe *et al.*, 2000). No mexilhão *Mytilus edulis* a taxa de assimilação de Cd a 20°C foi superior à encontrada a 15°C em diferentes tecidos (Everaarts, 1990). O mesmo padrão de acumulação foi observado noutra espécie de mexilhão (*M. galloprovincialis*), em que a taxa de acumulação de Cd nas brânquias aumentou com o aumento da temperatura (Serafim *et al.*, 2002). Watkins & Simkiss (1988), também observaram em *M. edulis* um aumento da incorporação de Zn com o aumento da temperatura.

A presença de agentes complexantes é outro factor que condiciona a disponibilidade dos metais. Por exemplo, o EDTA reduz a disponibilidade de Cu e de Zn na ostra *C. virginica* (Zamuda & Sunda, 1982).

Os níveis de oxigénio também podem influenciar a biodisponibilidade dos metais. Na amêijoia *Macoma balthica* concentrações baixas de oxigénio, resultam numa maior biodisponibilidade de Cu e consequentemente num aumento da incorporação de Cu por parte destes organismos (Neuhoff, 1983).

1.1.5.2. Interações metálicas

Na presença de vários contaminantes podem surgir fenómenos de antagonismo ou sinergismo e influenciar a bioacumulação metálica por parte dos organismos. De uma forma geral, as contaminações ambientais são polimetálicas e por vezes constituídas por vários tipos de contaminantes. Essas interações são muito variáveis segundo a espécie (Tabela 1.9) e mesmo o órgão considerado.

Uma fonte importante de variação dessas interações está relacionada com as vias de exposição dos contaminantes (contaminação directa ou via trófica), o tempo de exposição, a concentração externa relativa de cada contaminante e o carácter essencial ou não dos elementos metálicos. Por outro lado, essas interações podem

ocorrer a diferentes níveis: no meio exterior (interacções geoquímicas), ao nível de locais de absorção na membrana e no meio intracelular (competição para os diferentes ligandos) (Amiard-Triquet & Amiard, 1998).

Tabela 1.9 – Exemplos de fenómenos de interacções metálicas (sinergismo ou antagonismo) em diferentes espécies de bivalves expostas a uma contaminação polimetálica.

Espécie	Exposição	Efeito	Referência
<i>Anadonia cygnea</i>	Cd (122 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Cu (139 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Antagonismo recíproco	Holwerda, 1991
<i>Crassostrea gigas</i>	Cu (0.05 mg l^{-1}) + Pb (0,20 mg l^{-1})	Cu + Pb/Cd antagonismo depois de 20 e 28 dias	Amiard-Triquet & Amiard, 1998
	Ag (10 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Cu + Pb/Zn não foi detectado efeito	
	Cu (30 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Não foi detectado efeito na incorporação de Cu	Ettajani <i>et al.</i> , 1992
<i>Dreissena polymorpha</i>	Cu (16 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Zn (377 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Cd (113 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Cu/Ag sinergismo dependendo da fonte de contaminação	*
<i>Macoma balthica</i>	Cu (16 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Zn (377 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Cd (113 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Não foi detectado efeito na incorporação dos diferentes metais	Kraak <i>et al.</i> , 1993
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Cd (45 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Zn (540 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Zn/Cd antagonismo	McLeese & Ray, 1984
<i>Mulinia lateralis</i>	Cd (0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Cd/Zn não foi detectado efeito	Amiard-Triquet & Amiard, 1998
		Cd/Cu antagonismo	
<i>Mytilus edulis</i>	Cd (5 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Zn (0,50 ou 1 mg l^{-1})	Zn/Cd antagonismo	Amiard-Triquet & Amiard, 1998
	Cd (0,01-60 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + Cu, Fe, Hg, Pb, ou Zn (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	Não foi detectado interacção na incorporação de Cd nas brânquias	Carpene & George, 1981
	Cd (200 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Se (141 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Não foi detectado efeito	Bjerregaard, 1988
	Cd (200 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Se (7031 $\mu\text{g l}^{-1}$)	Se/Cd sinergismo	*
	Cd (5 $\mu\text{g l}^{-1}$) + Zn (0,50 ou 1 mg l^{-1})	Zn/Cd antagonismo	Amiard-Triquet & Amiard, 1998

1.1.5.3. Parâmetros alométricos

A concentração metálica pode variar com o tamanho/peso e a idade dos organismos. Duma forma geral, os estudos efectuados em laboratório com moluscos, crustáceos e peixes indicam que a acumulação metálica é mais pronunciada nos indivíduos mais

pequenos, devido à superfície relativamente elevada em relação ao volume (Brown & Depledge, 1998) bem como ao metabolismo mais activo (Ringwood, 1993).

1.1.5.4. Factores sazonais

A variação sazonal é um factor importante na variação da concentração metálica nos organismos. Este factor inclui a variação de outros factores, tais como o crescimento, a abundância de alimento, a reprodução e as condições ambientais (temperatura, concentração em azoto e fósforo, irradiação) (Brown & Depledge, 1998). Em vários estudos, as variações sazonais foram principalmente atribuídas a um aumento de peso dos organismos durante o período da reprodução, levando a um fenómeno de diluição biológica da concentração metálica (Amiard *et al.*, 1994; Regoli & Orlando, 1994; Amiard & Berthet, 1996).

As diferenças sazonais na concentração metálica, também podem estar dependentes do sexo dos organismos. Por exemplo, no mexilhão *M. edulis* foram encontradas concentrações de Zn mais elevadas nas gónadas das fêmeas relativamente à dos machos (Lobel & Wright, 1983).

1.1.5.5. Factores genéticos

A informação genética, das diferentes espécies e mesmo dentro da mesma espécie, pode ter efeitos sobre a permeabilidade, as necessidades essenciais, os locais de fixação e armazenamento, a concentração em enzimas e outros processos que estão ligados ao metabolismo dos metais (Langston & Spence, 1995) e consequentemente na bioacumulação metálica. Lobel *et al.* (1982) observaram em mexilhões (*M. edulis*), de tamanho e idade semelhantes e provenientes do mesmo local, concentrações de Ag que variaram significativamente entre indivíduos (14 vezes), mostrando que na mesma espécie determinados organismos apresentam a capacidade de regular este metal e outros assimilam este elemento a níveis consideravelmente mais elevados.

1.1.5.6. Estratégias que limitam a incorporação de metais nos organismos

Alguns organismos para limitar a acumulação de metais, são capazes de reduzir a biodisponibilidade dos metais no meio ambiente segregando agentes seladores. Algumas espécies podem limitar a incorporação de metais à sua superfície através da produção de muco. Este fenómeno foi observado na ostra *C. gigas* (Engel & Fowler, 1979).

Outros processos que limitam a incorporação de metais foram descritos por Mason & Jenkins (1995), tais como, a diminuição da permeabilidade da superfície epitelial, a redução do transporte de metais através da bicamada lipídica, bem como a presença de barreiras físicas (carapaças e conchas).

O comportamento de isolamento por parte dos animais, também corresponde a uma estratégia de limitação da penetração metálica. Nos bivalves o encerramento das valvas é um comportamento conhecido em resposta à presença de metais no meio (Baldwin & Kramer, 1994).

1.1.6. PENETRAÇÃO DOS METAIS ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR

Para a maioria dos invertebrados marinhos, incluindo os moluscos, a incorporação dos metais pode ocorrer directamente por difusão da água circundante através de superfícies corporais permeáveis, ou através da incorporação de alimento tanto de formas particuladas como dissolvidas (Depledge & Rainbow, 1990). Existem várias vias possíveis de incorporação para a maioria dos metais (Figura 1.1).

A transferência de metais através da membrana plasmática das células ocorre provavelmente por difusão facilitada. Simkiss & Taylor (1989) mostraram que o Cu e Zn parecem ser incorporados através de uma proteína de transporte membranar com uma especificidade abrangente e que permite a passagem destes metais através da membrana celular. Viarengo (1989) também sugere que a membrana plasmática contém proteínas intrínsecas que permitem a passagem selectiva dos iões.

Por outro lado, a incorporação de iões essenciais, tais como o Ca, K e Na, ocorre através de processos dependentes de energia para atravessar a membrana celular. Estes iões não apresentam grande afinidade com os ligandos orgânicos e movem-se através das membranas celulares hidrofóbicas contra gradientes de concentração através de bombas de transporte activo (Rainbow & Dallinger, 1993). O facto dos metais do grupo B (Cu, Zn, Hg, Cd) poderem atravessar a membrana celular um milhão de vezes mais rápido que o Na e K, sugere que as membranas não constituem barreiras e que o controlo dos metais do grupo B deve ser visto como dependente, por exemplo, dos ligandos intracelulares com maior ou menor especificidade (Viarengo, 1989).

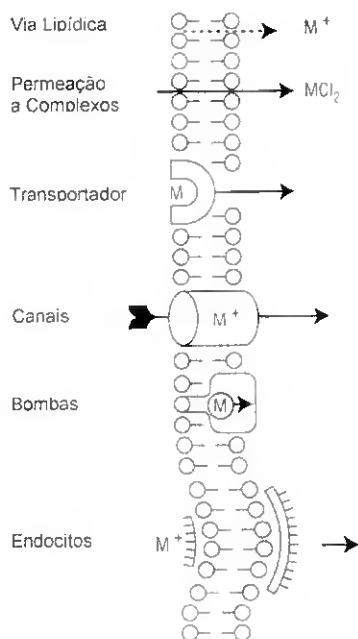


Figura 1.1 – Mecanismos propostos para o fluxo de entrada de iões metálicos nas células. M - iões metálicos (Phillips, 1993).

I

No caso da incorporação de Zn nos mexilhões, Elliot *et al.* (1986) sugeriram um mecanismo de difusão passiva, e outros autores (Phillips, 1977c; George *et al.*, 1978, George & Pirie, 1980) sugerem que a maioria do Zn é filtrado com o alimento e absorvido no interior dos mexilhões através do sistema digestivo, brânquias e manto. No entanto, noutros casos, como o Cd, a sua incorporação pode estar relacionada com transporte por bombas de iões que servem para a passagem de iões essenciais (Depledge & Rainbow, 1990). Viarengo *et al.* (1993) mostraram a inibição de ATP cálcico das membranas plasmáticas das células das brânquias do mexilhão *M. galloprovincialis* com diferentes metais (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}). Chang *et al.* (1997) mostraram que o Cd perturbava a cinética de entrada do Ca nas células das larvas do peixe *Tilapia* provocada pela competição entre estes dois cátions para os canais cálcicos. O Hg, contrariamente a outros metais, é muito lipofílico na forma inorgânica (HgCl_2). A característica lipofílica permite às espécies Hg atravessar rapidamente a membrana celular (Farrell *et al.*, 1990; Boudou *et al.*, 1991; Mason *et al.*, 1984). Gutnecht (1981) mostrou que o HgCl_2 atravessa uma bicamada lipídica artificial vinte vezes mais depressa que a água e um milhão de vezes mais depressa que o Na^+ com uma bomba.

Estudos recentes indicam que a incorporação de metais pode ser específica de cada espécie (Wang, 2002). Por exemplo, os canais de Ca estão envolvidos na incorporação de Cd e Zn no mexilhão *M. edulis* (Wang & Fisher, 1999; Vercauteren & Blust, 1999) e nas brânquias da ostra *C. virginica* (Roesijadi & Unger, 1993), mas não na amêijoia *M. balthica* (Wang & Fisher, 1999) e no mexilhão *Septifer virgatus* (Wang & Dei, 1999).

Por outro lado, os metais ligados ao material particulado são incorporados pelos moluscos aquáticos maioritariamente via endocitose, ou seja, através de um mecanismo de transporte activo que requer energia (George *et al.*, 1975).

Dentro da célula os iões ligam-se a uma variedade de ligandos que mantêm um gradiente de difusão directa e evitam o efluxo de metais. A taxa de acumulação de metais é determinada pelo número e características dos ligandos disponíveis e a sua afinidade com os metais (Mason, 1983).

1.1.7. METABOLISMO CELULAR DOS METAIS

A concentração e distribuição de metais nos organismos aquáticos estão altamente dependentes dos processos bioquímicos do metabolismo dos metais que ocorrem dentro das células. Muitos destes processos e/ou sistemas associados de captação de metais são comuns num extenso número de Filos, reflectindo o seu sucesso evolutivo na regulação de elementos essenciais (Cu, Zn, Fe, Mn, Co) para fins fisiológicos, biológicos e morfológicos. Por outro lado, existem também mecanismos únicos de sequestro de metais em determinados grupos taxonómicos (Langston *et al.*, 1998).

Existe uma grande diversidade na natureza do metabolismo de metais, que se traduzem por uma série de comportamentos em termos de incorporação, desintoxicação e armazenamento. Compreender as estratégias adoptadas pelos diferentes organismos aquáticos no seu envolvimento com metais quer sejam essenciais, não essenciais ou metais essenciais em excesso, é a chave para avaliar o significado ecotoxicológico na capacidade de acumulação de metais (Langston *et al.*, 1998).

Os organismos aquáticos desenvolveram sistemas subcelulares para acumulação, regulação e imobilização de metais (George *et al.*, 1979; Viarengo & Nott, 1993). Estes incluem moléculas solúveis como a metalotionina e outras metaloproteínas, tais como algumas enzimas antioxidantes, ou a compartimentalização em lisossomas, grânulos e vesículas ligadas a membranas. Ao nível do citosol, um dos sistemas mais importantes é a ligação dos metais a proteínas de baixo peso molecular e ricas em agrupamentos SH: as metalotioninas (Figura 1.2). Neste trabalho dar-se-á ênfase a estas proteínas, pelo que as suas propriedades estruturais e funcionais serão desenvolvidas mais detalhadamente na secção 1.2 deste Capítulo.

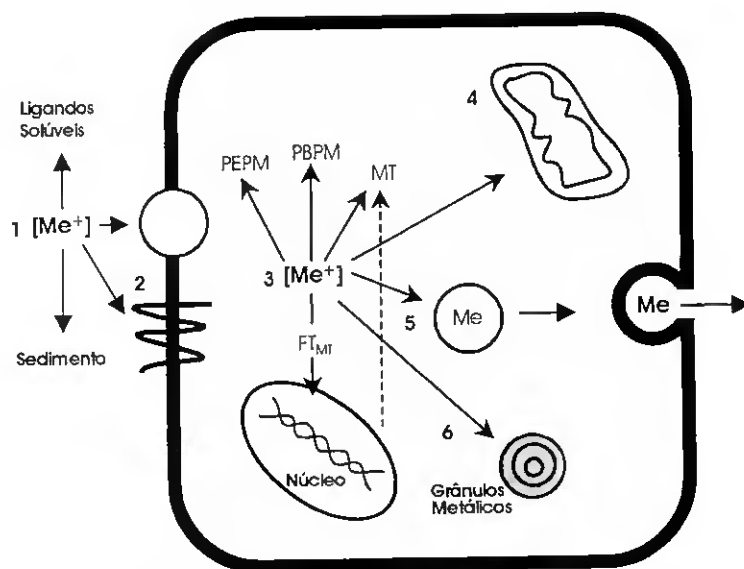


Figura 1.2 – Representação esquemática do metabolismo e toxicidade dos metais nas células eucarióticas de invertebrados marinhos (adaptado de Di Giulio *et al.* (1995)).

- (1) No meio aquático o metal pode interagir com uma série de ligandos abióticos (ex. substâncias húmicas), isto pode suceder quer ao nível da coluna de água quer no sedimento;
- (2) A entrada dos metais na célula é feita geralmente através de canais iónicos ou proteínas transportadoras, localizadas na membrana plasmática (Figura 1.1);
- (3) No citoplasma, o metal livre pode ligar-se à metalotionina, a ligandos de baixo peso molecular (glutathione, fitoquelatinas) ou de elevado peso molecular (metaloenzimas), ou ainda a factores de transcrição específicos da metalotionina (FT_{MT}), que interagem com elementos reguladores específicos para o metal (MRE), localizados no promotor do gene da MT aumentando a transcrição e a síntese da MT;
- (4) O aumento da concentração de metal na mitocôndria pode levar à ligação do metal a enzimas ou complexos proteicos, cruciais na cadeia respiratória, reduzindo a eficiência de conversão de energia e causando problemas de natureza oxidativa;
- (5) Em alguns tipos de células, os metais são englobados em lisossomas, saindo da célula por exocitose;
- (6) Os metais são também englobados em depósitos granulosos constituídos por camadas concêntricas, denominados esferocristais. Estes grânulos metálicos desempenham nos invertebrados marinhos um papel preponderante na desintoxicação dos metais. Os esferocristais derivam provavelmente de uma modificação do retículo endoplasmático (Simkiss, 1984).

Outra estratégia de desintoxicação e compartimentalização de metais, que ocorre nos invertebrados, é a sua acumulação em formas insolúveis menos reactivas. Os metais alcalinos e alcalino-terrosos (Na, Mg, K e Ca), os metais de transição (Ti, V, Cr, Mn,

Fe, Co e Ni) e metais de pós-transição (Cu e Zn) são incorporados em grânulos minerais esféricos, onde estão ligados electrostaticamente como fosfatos insolúveis (George, 1982; Taylor & Simkiss, 1984; Nott & Nicolaidou, 1989; Marigómez *et al.*, 2002). A incorporação dos metais em grânulos localizados nos lisossomas e vesículas reduz a toxicidade intracelular conduzindo eventualmente à sua exocitose e posterior eliminação do organismo. De facto, este mecanismo de captação de metais em vesículas limitadas por membranas, pode representar uma estratégia geral de homeostasia metálica. Os grânulos dos diferentes tecidos de invertebrados podem ser classificados em três tipos, com base nas características químicas e citológicas: grânulos ricos em ferro, grânulos de cobre-enxofre (Cu-S) e grânulos de magnésio-cálcio (Mg/Ca) (Nott & Nicolaidou, 1994).

A outra possibilidade de captação dos metais é a inclusão destes elementos nos lisossomas e em particular nos lisossomas terciários. Numerosos estudos provaram a presença de metais nestes organelos (George & Viarengo, 1985). Os metais podem penetrar nos lisossomas através das ATPs cálcicas. Nos lisossomas, os metais podem ser acumulados em formas não tóxicas para o organismo. Diferentes tipos de reacções bioquímicas estão implicadas na acumulação dos metais nos lisossomas (Viarengo & Nott, 1993).

1.1.7.1. Distribuição subcelular dos metais

A importância relativa de cada um dos processos atrás referidos proporciona uma distribuição subcelular dos diferentes metais entre a fracção citosólica e a fracção insolúvel (núcleo, membranas e grânulos minerais). Esta distribuição não depende apenas dos metais, dos organismos ou do órgão estudado, como também do grau de contaminação, da estação do ano e das diferentes etapas de vida do organismo. Na Tabela 1.10 encontra-se exemplificada a variação na distribuição dos metais em diferentes espécies.

Tabela 1.10 – Percentagem de metais na fracção citosólica de diferentes espécies de invertebrados marinhos (PC - fracção citosólica).

Espécie	Tecidos	Condições	Fracção citosólica	Referência
Moluscos				
<i>Crassostrea gigas</i>	Total	Laboratório (20 µg Ag l ⁻¹) <i>In situ</i>	50% de Ag – controlo; 19% de Ag – contaminada. 60-70% de Cd.	Berthet, 1990
<i>Crassostrea virginica</i>	Brânquias	<i>In situ</i>	28% de Zn; 23% de Cu; 30-66% de Cd dependendo do local e da estação do ano.	Mouneyrac <i>et al.</i> , 1999; Roesijadi, 1994a
	Gl. Digestiva			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Brânquias	<i>In situ</i>	50% de Cu e Zn; 10-15% de Pb e Fe.	Regoli & Orlando, 1994
	Visceras	<i>In situ</i>	Variação da distribuição subcelular de Cd ao longo do ano.	Serra <i>et al.</i> , 1999
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (larvas)	Manto	Laboratório	41% de Cd; 27% de Hg; 56% de Zn.	Pavicic <i>et al.</i> , 1994a
	Músculo aductor			
<i>Ruditapes decussatus</i>	Total	Laboratório (500 µg Cd l ⁻¹ ; 150 µg Cu l ⁻¹ ; 1000 µg Zn l ⁻¹)	84% de Cd; 52% de Cu; 12% de Zn.	Roméo & Gnassia-Barelli, 1995
	Brânquias			
	Gl. Digestiva			
	Resto			
			66% de Cd; 44% de Cu.	
	Gl. Digestiva	<i>In situ</i>	Variação da distribuição subcelular de Cd, Cu e Zn nos meses de Junho, Julho, Agosto e Setembro.	Hamza-Chaffai <i>et al.</i> , 1999
Crustáceos				
<i>Carcinus maenas</i>	Brânquias	<i>In situ</i>	A percentagem de Cd e de Cu aumenta com o grau de contaminação.	Legras <i>et al.</i> , 2000
	Hepatopâncreas			
<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Brânquias	<i>In situ</i>		
	Hepatopâncreas			

1.2. METALOTIONINAS

O grande número de funções que as proteínas desempenham é definido tanto, pelas conformações estruturais como pelos seus centros activos. Muitas proteínas possuem na sua estrutura iões metálicos que são capazes de se fixarem nos centros activos, sendo designadas sob o termo geral de metaloproteínas. Estas proteínas pertencem a duas categorias segundo apresentam ou não actividade enzimática. Cerca de um terço de todas as enzimas conhecidas necessitam de iões metálicos como cofactores de actividade catalítica (Voet *et al.*, 1999), entre os quais 70% são metais de transição essenciais tendo uma coordenação com o enxofre em algumas ou todas as suas manifestações biológicas. Estes iões metálicos são essenciais para a catálise de inúmeras actividades biológicas vitais incluindo a transferência de electrões, fixação de oxigénio, redução de sulfitos e nitritos, hidrólise e reacções de desidrogenação (Chan *et al.*, 2002).

As metalotioninas (MTs) pertencem à segunda categoria e são consideradas como derivados metálicos de uma proteína rica em enxofre chamada tionina (Amiard & Cosson, 1997). A primeira proteína tendo as características das MTs foi detectada no córtex renal do cavalo por Margoshes & Vallée (1957), tendo sido identificada como responsável pela ligação de Cd, Cu e Zn e consequentemente pela acumulação destes metais no rim do cavalo. Posteriormente esta proteína foi purificada e caracterizada por Kägi & Vallée (1961). As MTs são proteínas ubíquas, sendo encontradas em mamíferos, peixes, crustáceos, moluscos e alguns organismos unicelulares, muitas vezes apresentando diferentes isoformas dentro destes grupos taxonómicos (Stillman *et al.*, 1992).

As MTs constituem uma classe de proteínas solúveis, não enzimáticas, com uma única cadeia polipeptídica e de baixo peso molecular (6-7 kDa). A sua composição é bastante característica, com um conteúdo de cerca de 30% de resíduos cisteicos, uma quantidade elevada de resíduos de serina, lisina e arginina e ainda a ausência de aminoácidos aromáticos e de histidina (Nordberg, 1998).

Estas metaloproteínas ligam-se com grande afinidade a iões metálicos d^{10} de vários tamanhos, como Cd (II), Cu(II), Zn(II), Hg(II) em dois centros activos metal-

enxofre. Esta afinidade deve-se à abundância de sequências contendo cisteína (Cys) (Messerle *et al.*, 1992).

Na Tabela 1.11 encontram-se resumidas as características das MTs resultante da compilação dos dados referidos desde o primeiro encontro internacional sobre MT (Nordberg & Kojima, 1979) com os dados mais recentes sobre esta proteína.

Tabela 1.11 – Características das MTs (adaptado de Nordberg (1998)).

-
1. Baixo peso molecular (6Kda – 7Kda);
 2. Elevado conteúdo em cisteína (20 - 30%); Ausência de aminoácidos aromáticos e histidina; N acetilmetionina; C-alanina;
 3. Sequência única de aminoácidos (60-62 aminoácidos);
 4. Estrutura terciária com dois domínios;
 5. Elevado conteúdo em metal (Cd, Zn, Cu e Hg) correspondendo a 5 -10% ph/ph;
 6. Absorção para as ligações Metal-S: 250 nm (Cd), 225 nm (Zn), 275 nm (Cu) e 300nm (Hg);
 7. Síntese induzida por factores exógenos e endógenos;
 8. Não apresenta ligações bisulfureto;
 9. Termicamente estável;
 10. Proteínas solúveis, não enzimáticas, localizadas no citoplasma das células e nos cromossomas;
 11. Existência de polimorfismo estrutural (isoformas).
-

1.2.1. ESTRUTURA DAS METALOTIONINAS

1.2.1.1. Estrutura primária

A característica comum de todas as MTs é a ocorrência de uma sequência peptídica Cys-X-Cys, onde X representa um residuo aminoácido diferente de Cys e este último é altamente conservativo (Figura 1.3).

Nas MTs, a apoproteína, aparenta ter uma estrutura predominantemente desordenada. No entanto, após a ligação de iões metálicos à apoMT, a proteína adquire uma forma bem definida com dois domínios distintos (Romero-Isart & Vašák, 2002):

- o domínio α composto por 11 cisteínas, em que algumas estão associadas duas a duas Cys-Cys, com um terminal carboxílico (C-terminal);
 - o domínio β com 9 cisteínas, em que não existem duas cisteínas consecutivas.
- Este segmento termina com a função amina (N-terminal) (Figura 1.3).

Estes dois domínios, de tamanho equivalente (diâmetro: 15 a 20 Å) estão ligados ao nível dos aminoácidos 30 e 31 (2 lisinas) formando uma molécula linear de dimensão máxima de 30 a 35 Å. Estas moléculas encontram-se dobradas em torno dos íons metálicos ligados aos átomos de enxofre das cisteínas (Vašák *et al.*, 1987). A formação geométrica específica destas coordenações requerem que a cadeia polipeptídica se dobre em torno dos íons metálicos, formando “clusters” altamente organizados de metal-tiolato com coordenação tetraédrica para o Zn(II) e Cd(II) e coordenação triangular para o Cu(I) e Ag(I) (Chan *et al.*, 2002).

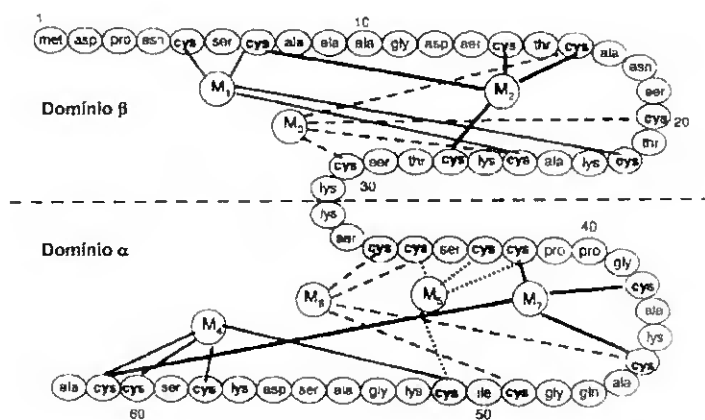


Figura 1.3 – Sequência primária de aminoácidos da MT2A de fígado de coelho. O domínio β encontra-se localizado no N-terminal da proteína e consiste nos resíduos de 1-31. O domínio α está localizado no C-terminal e consiste nos resíduos de 32-62 (adaptado de Chan *et al.* (2002)).

I

Os dois domínios das MTs não fixam o mesmo número de iões: 4 para o α e 3 para o β no caso dos iões metálicos divalente como o Cd(II) e Zn(II) e 6 para os domínios α e β no caso dos iões metálicos monovalentes tal como, o Cu(I), Au(I) e Ag(I) (Chan *et al.*, 2002). Outros autores também referem a presença de 17 ou 18 iões de Ag ligados ao nível dos dois domínios (George & Olsson, 1994; Mason & Jenkins, 1995).

Estes dois domínios não se preenchem simultaneamente e apresentam afinidades diferentes consoante os metais: O Zn e Cd ligam-se mais fortemente ao domínio α que ao β , ao passo que o Cu e a Ag apresentam uma afinidade inversa (Kägi & Nordberg, 1979). Por outro lado, a estabilidade dessas ligações varia com o metal fixado: para o Cu é 100 vezes mais elevada do que para o Cd, sendo esta cerca de 1000 vezes mais estável relativamente ao Zn. O Hg e Ag têm uma afinidade para as MTs muito maior que o Cu (Amiard & Cosson, 1997). Deste modo, a afinidade dos iões metálicos para os centros activos desta proteína segue a seguinte ordem: Hg(II) > Ag(I) - Cu(I) > Cd(II) > Zn(II) (Stillman, 1995). A substituição de catiões metálicos nestas proteínas e em outros ligandos é condicionada pela estabilidade das diferentes ligações, e também pela concentração de cada um dos elementos no meio (Otvos *et al.*, 1993).

Uma indicação do polimorfismo genético associado a estas proteínas é a presença, em algumas espécies, de várias isoformas de MT, com pequenas diferenças na sua estrutura primária, embora suficiente para as diferenciar em termos de carga total da proteína (Kägi & Kojima, 1987).

As quatro maiores isoformas encontradas nos mamíferos (MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4) diferem relativamente aos aminoácidos (excepto nos 20 Cys partilhados) e à carga iónica (Tabela 1.12).

A composição metálica das proteínas nativas depende da fonte natural e da exposição prévia aos metais. As isoformas MT-1 e MT-2 isoladas no fígado humano contêm principalmente Zn, enquanto que as isoladas no rim contêm principalmente Cd com algum Cu e Zn (Romero-Isart & Vašák, 2002). Em organismos superiores, as MTs são as únicas proteínas nas quais o Cd é acumulado naturalmente (Kägi, 1991). As formas específicas de MT-3 e MT-4 contêm Zn e Cu em ambos os tecidos de mamíferos. Contrariamente às formas de MTs dos mamíferos que podem ligar-se a Zn, Cd e Cu simultaneamente, as MTs das leveduras e fungos contêm exclusivamente Cu(I) (Romero-Isart & Vašák, 2002).

No que respeita aos invertebrados aquáticos, são conhecidas algumas estruturas primárias das MTs. Numerosas isoformas foram descobertas no mexilhão *M. edulis* (Mackay *et al.*, 1993), na ostra *C. virginica* (Roesijadi *et al.*, 1989), nos caranguejos, *Callinectes macnas* (Pedersen *et al.*, 1994) e *Callinectes sapidus* (Brouwer & Brouwer-Hoexum, 1991; Brouwer *et al.*, 1992, 1995). Relativamente à amêijoia em estudo, *R. decussatus*, foram identificadas quatro isoformas na glândula digestiva após exposição ao Cd. Duas destas isoformas de MT foram purificadas, caracterizadas e determinada a sequência de aminoácidos na zona do N-terminal (Bebiano *et al.*, 2000; Simes *et al.*, 2003) (Tabela 1.12).

Tabela 1.12 – Sequência de aminoácidos em MTs de mamíferos e em invertebrados.

1 Humano	MT-1a	MDP . N C S C A T . G G S C T C T G S C K C K E C K C T . S C K . K . S . C . C . G S C P M S C A K C A G S C . C . C A
2	MT-2	MDP . N C S C A A . G D S C T C A G S C K C K E C K C T . S C K . K . S . C . C S C P V G C A K C A G S C . C . C A
3	MT-3	MDP . T C P C R S . G G S C T C A D S C K C K E C K C T . S C K . K . S . C . C S C P A E C K C A G S C . C . C A
4	MT-4	MDP . E C V C N S . G G I C M C G D N C K T T C N C K . T C R . K . S . C . C P C P P G C A K C A G S C . C . C A
5 Rato	MT-1	MDP . N C S C S T . G G S C T C S S G C K C K E C K C T . S C K . K . S . C . C S C P V G C A K C A G S C . C . C A
6 Hamster	MT-2	MDP . N C S C A T . D G S C C A G S C K C K E C K C T . T C K . K . S . C . C S C P V G C A K C A G S C . C . C A
7 Caranguejo	MT-1	. P G . P C . C N D . K . . C V C K E G G C K E C K C T . S C R C S P C E K C S S G C . K C A . N R E C S K T . C S K A C . S . C . C P
8 Ostra	CdBP-1	M S D . P C N C I E . T G T C A C S D S C P A T G C K G P C K C G D . C C K A G C K V K C . S O T S E G G C K C K E K . C U G P C A P G C S C K
9 Mexilhão	CdBP 10-IV	. P A . P C N C I E . T N V C I C D T G C S G E S C R C G D A C K C S G A D C K S G C K V V C . K C S . . G S C A C E G G . C U G P C A P G C S C K
10 Mexilhão	CdBP 20-1a	. P G . P C N C I E . T N V C I C G T G C S G K G C R C R G D A C K C A . S G C G C S G C K V V C . K C S . . G T C K C G C D . C U G P C A P G C S C K
11 Amêijoia	CdMT-1	. G D . P C N V A E . T G Q C V C A Q C C K
12 Amêijoia	MT-2	. G E . P C N

(1) Richards *et al.*, 1984; (2) Karin & Richards, 1982; (3) Uchida *et al.*, 1991; (4) Quafie *et al.*, 1994; (5) Anderson *et al.*, 1983; (6) Griffith *et al.*, 1983; (7) Lerch *et al.*, 1982; (8) Roesijadi *et al.*, 1989; (9 e 10) Mackay *et al.*, 1993; (11 e 12) Simes *et al.*, 2003.

1.2.1.2. Estrutura terciária

A primeira estrutura tridimensional desta proteína foi a MT-2 de mamífero obtida tanto por NMR, como por raios-X e por métodos cristalográficos (Figura 1.4). Foi também identificada a estrutura tridimensional completa de Me(II)-MT em dois invertebrados: a $^{113}\text{Cd}_6\text{-MT-1}$ no caranguejo azul (*Callinectes sapidus*) (Narula *et al.*, 1995) e $^{113}\text{Cd}_7\text{-MTA}$ no ouriço-do-mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) (Riek *et al.*, 1999). A única estrutura 3-D de MT contendo Cu(I) foi descrita na levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) com 53 aminoácidos (Bertini *et al.*, 2000).

As estruturas tridimensionais formadas pela ligação de metais dependem não só do metal ligado, como também do número de metais ligados à proteína, e da coordenação preferencial de cada metal (tetraédrica, triangular ou diagonal) (Chan *et al.*, 2002).

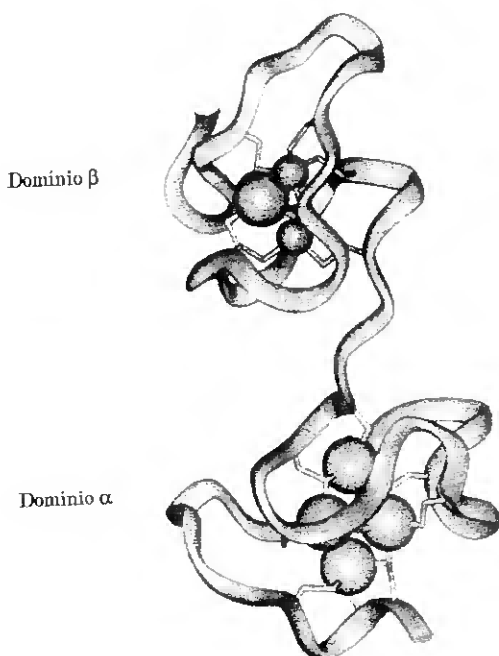


Figura 1.4 – Estrutura terciária da molécula de MT-2 de fígado de rato obtida por cristalografia de raios-X. Resíduos de 1-30 englobando o grupo $\text{Cd}_1\text{Zn}_2\text{Cys}_9$ no N-terminal do domínio β e os resíduos de 31-61 o grupo $\text{Cd}_4\text{Cys}_{11}$ no C-terminal do domínio α (Romero-Isart & Vašák, 2002).

1.2.2. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS METALOTIONINAS

O sistema de nomenclatura das metalotioninas foi inicialmente adoptado em 1978 (Nordberg & Kojima, 1979) e modificado em 1985 pela subdivisão das MTs em 3 classes (Fowler *et al.*, 1987) (Tabela 1.13).

Com o aumento do número de sequências de MT (aproximadamente 200), assim como variações apreciáveis no comprimento das sequências, na composição em aminoácidos, no número e na repartição dos agrupamentos Cys, a subdivisão em 3 classes foi considerada inadequada. Por este motivo, alguns autores (Kojima *et al.*, 1999; Binz & Kägi, 1999) propuseram uma nova nomenclatura constituída por famílias, sub-famílias, sub-grupos e isoformas utilizando principalmente as similaridades das sequências e das relações filogenéticas. Assim, as MTs seriam classificadas em 15 famílias diferentes.

Com esta classificação as MTs dos moluscos, pertencem à família 2 e apresentam um padrão sequencial: Cys-x-Cys-x(3)-Cys-Thr-Gly-x(3)-Cys-x-Cys-x(3)-Cys-x-Cys-Lys, localizado no terminal carboxilo da proteína. As características conhecidas da MT de moluscos incluem 64 a 75 aminoácidos, 18 a 23 Cys, pelo menos 13 totalmente conservadas. Esta família apresenta 4 subfamílias (mol- mexilhão MT1, mol- mexilhão MT2, mol- gastrópodes e mol- outros moluscos) (Binz & Kägi, 1999).

Tabela 1.13 – Critério de classificação de metalotioninas segundo Fowler *et al.* (1987).

Classe I	Agrupa todas as MTs postas em evidência nos vertebrados e MTs isoladas em outros Filos, apresentando um alinhamento das cisteínas muito próximo da dos mamíferos. Esta classe também inclui para além das MTs dos mamíferos as MTs isoladas de certos crustáceos e moluscos (<i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> , <i>C. gigas</i>).
Classe II	Contêm as proteínas com várias propriedades idênticas às das MTs, mas sem homologia com as MTs dos mamíferos. Esta classe inclui particularmente as MTs isoladas na drosófila, no ouriço-do-mar, nos nemátodes, nos cogumelos e nas cianobactérias.
Classe III	Agrupa as moléculas não proteicas que se ligam a metais, formando complexos de enxofre, constituídos pela repetição de fragmentos oligopeptídicos (Glu(-Cys)) _n -Gly (n = 2 a 8). Estes compostos não são produzidos directamente por um gene, mas sim sintetizados a partir da glutatona, não tendo nenhuma relação genotípica com as MTs comuns (Garvey, 1990). Os "fitoquelatinas" das plantas pertencem a esta classe, bem como as metalotioninas postas em evidência em algumas leveduras e algas (Rauser, 1993).

1.2.3. SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DAS METALOTIIONINAS

A expressão destas proteínas nas células e nos tecidos dos animais é induzida por diferentes iões metálicos, nomeadamente os metais de transição como Cd, Zn, Mg, Cu, Hg, Pb, Cr, Bi, Ni, Ag e Co, destes metais o Cd é o melhor indutor seguido do Zn (Vašák, 1991).

Apesar dos metais referidos constituírem os indutores de MT mais potentes, existem outros agentes capazes de induzir a síntese das metalotioninas nas células. Estes agentes podem ser endógenos ou exógenos, como por exemplo:

- (i) Factores de stress – temperaturas elevadas; exposição a radiação X e UV; elevada pressão de O₂; privação de alimento; infecção; stress físico; hipotermia; alteração da salinidade (Kägi, 1991; Gerpe *et al.*, 2000).
- (ii) Hormonas e mensageiros secundários – glucocorticoides; progesterona; estrogénio; insulina; glucagon; adenosina; cAMP; diacilglicerol (Kägi, 1991; Gerpe *et al.*, 2000).
- (iii) Agentes inflamatórios – lipopolissacáridos; dextrano; endotoxina (Kägi, 1991; Gerpe *et al.*, 2000).
- (iv) Agentes citotóxicos – etanol, butirato; agentes alquilantes; ácidos gordos; clorofórmio; di (2-etilexil) ftalato; tetracloreto de carbono; formaldeído; etionina; uretano; D penicilamina; estradiol (Kägi & Schaffer, 1988; Kägi, 1993).
- (v) Espécies reactivas de oxigénio - Os fenómenos de peroxidação lipídica, com formação de radicais livres levam igualmente à indução da síntese de metalotioninas (Viarengo, 1994; Andrews, 2000).

A indução da síntese de metalotioninas pelos metais foi descrita por Roesijadi (1992) (Figura 1.5).

A transcrição do gene das metalotioninas depende da concentração metálica intracelular (Me²⁺), sendo modelada pelas interacções entre factores de transcrição metálica FTM (Factor de Transcrição Metálico) e os elementos reguladores correspondentes ERM (Elementos de Regulação Metálica), em que o Zn apresenta

um papel fundamental. Ou seja, o Zn intracelular liga-se ao inibidor do FTM tornando este factor activo e com a possibilidade de poder interagir com as sequências ERM do promotor de MT e activar a transcrição.

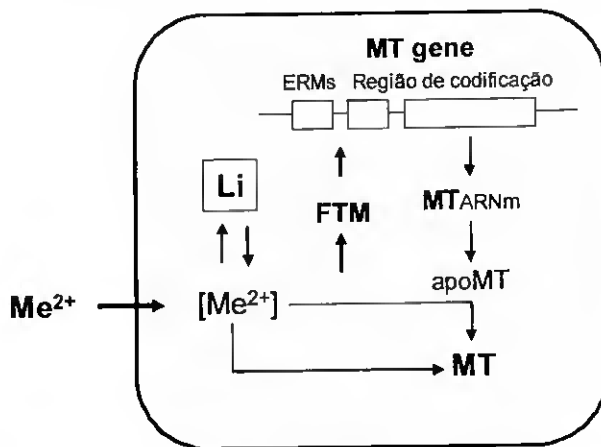


Figura 1.5 - Indução da síntese de metalotioninas pelos metais descrita por Roesijudi (1992). ERM - Elementos de Regulação Metálica; FTM - Factor de Transcrição Metálico; Li - Ligando; Me - Metal.

Os outros metais (como o Cd, Cu e Hg) não agem directamente nos factores que controlam a transcrição. Estes elementos apresentam uma grande afinidade pelos ligandos do Zn, substituindo este metal nas suas ligações provocando um consequente aumento da concentração de Zn intracelular, tornando-o livre de interagir com o inibidor do FTM. A MT sintetizada de novo pode ligar-se ao Zn livre, que poderá ser novamente substituído pelo Cd. O Zn novamente livre na célula pode voltar a ligar-se aos seus ligandos originais.

Foi demonstrado que o tempo de meia-vida da metalotionina varia em função do metal associado. De uma forma geral, o tempo de meia vida de Cd-tionina e Hg-tionina é superior ao de Zn-tionina (Webb, 1979; Dann *et al.*, 1997).

1.2.4. FUNÇÃO DAS METALOTIIONINAS

Apesar dos vários estudos sobre a metalotionina, a sua função exacta é ainda um assunto em discussão. No entanto algumas hipóteses têm sido consideradas (Tabela 1.14)

Tabela 1.14 – Função das MTs (adaptado de Nordberg (1998) e Chan *et al.* (2002)).

-
1. Actuam no transporte de iões metálicos para outras proteínas .
 2. Controlam as concentrações de iões livres de metais essenciais como o Zn e o Cu.
 3. Actuam como centro de armazenamento e fornecimento de metais.
 4. Actuam como agentes de desintoxicação de metais (por exemplo, Cd e Hg).
 5. Possuem uma função protectora na captação de metais.
 6. Protecção de um conjunto de factores de stress, incluindo a captação de radicais livres.
 7. Actuam ao nível da resposta imunitária
 8. Importante na genotoxicidade e protecção contra agentes carcinogénicos.
-

Foi proposto considerar dois tipos de MTs relativamente à função principal que desempenham: MTs constitutivas e indutivas. As MTs constitutivas representam o teor de base encontrado nos organismos e tem como principal função a homeostasia dos elementos essenciais. O segundo grupo de MTs corresponde às proteínas indutíveis que estão implicadas na desintoxicação dos metais em excesso (Langston *et al.*, 1998).

O envolvimento das MTs em processos de homeostase e regulação, nomeadamente na absorção e controlo metabólico de metais essenciais (como o Cu e o Zn) tem como principal função controlar a sua disponibilidade intracelular para compostos dependentes destes metais (ex: metaloenzimas, pigmentos respiratórios) (Bremner, 1991; Amiard & Cosson, 1997). Esta é a razão pela qual, organismos não expostos a contaminação metálica podem apresentar teores significativos desta proteína. As MTs podem controlar processos biológicos importantes que necessitam de enzimas contendo Zn. A sua acção pode ser directa por interacção com apoenzimas inactivas ou indirecta por regulação do Cu e do Zn disponível na célula. Mostrou-se que algumas apoenzimas dependentes de Zn podem ser reactivadas pela transferência deste metal das metalotioninas (Winge & Miklossy, 1982). Hathout *et al.* (2001)

demonstraram uma rápida transferência de Zn da MT para apo-peptídeos, nomeadamente para apo-peptídeos "Zn-finger".

Na desintoxicação de metais, a MT parece conferir resistência às células e ao próprio organismo contra a intoxicação por elementos metálicos não essenciais (Cd, Ag e Hg) ou excesso de metais essenciais (Cu e Zn) através do seu armazenamento em formas menos tóxicas, imobilizando-os e impedindo a sua fixação a certas proteínas de elevado peso molecular, evitando a sua desnaturação (Romero-Isart & Vašák, 2002). Diversas experiências evidenciaram a indução de MTs em organismos expostos a concentrações elevadas de metais, mostrando existir uma correlação entre a concentração metálica e os níveis destas proteínas. Roesijadi & Klerks (1989) e Unger *et al.* (1991) mostraram haver indução de MTs nas brânquias de ostras (*C. virginica*) devido à exposição a Cd. Viarengo *et al.* (1981) mostraram igualmente indução de MTs após contaminação de mexilhões com Cu e com Zn. A indução relativa da MT nas brânquias de *M. edulis* ocorre pela ordem seguinte: HgCdCuZn, ou seja, os elementos não essenciais são poderosos indutores da MT comparativamente com os essenciais, o que confirma a função destas proteínas na desintoxicação metálica (Langston *et al.*, 1998).

Além da função de regulação e desintoxicação, outra importante função das MTs encontra-se ao nível da protecção antioxidante do ADN. Esta hipótese tem por base a elevada concentração de MT encontrada no núcleo de algumas células, em conjunto com as suas propriedades de eliminação do radical hidróxilo, conferidas pelo elevado teor em cisteína que caracteriza estas proteínas (Chubatsu & Meneghini, 1993).

Cherian & Chan (1993) também identificaram a capacidade da MT na fixação de radicais livres. Assim, foi demonstrado que a MT nos mamíferos e em leveduras são captadores eficientes de radicais livres tais como o hidróxilo ($\text{OH}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) ou o óxido nítrico (NO). Em todos os casos, a interacção dos radicais livres dá-se ao nível dos grupos tiolato ligados aos metais, provocando a oxidação e/ou modificação da proteína com a consequente libertação dos iões metálicos. Estes efeitos podem ser reversíveis em condições redutoras e em presença dos iões metálicos apropriados (Romero-Isart & Vašák, 2002). Outros autores também observam uma resistência dos mexilhões *M. galloprovincialis* ao stress oxidativo após uma pré-exposição a Cd, o

I
que sugere que a MT induzida permite limitar os efeitos dos radicais hidróxilo (OH) e superóxido (O₂⁻) através da sua captação (Viarengo *et al.*, 1999a).

1.2.5. TEORES DE METALOTIONINAS EM INVERTEBRADOS MARINHOS

Nos invertebrados marinhos, as MTs foram identificadas em mais de 50 espécies diferentes em que 75% são moluscos ou crustáceos (Roesijadi, 1992; Langston *et al.*, 1998). As primeiras descrições de MT nos invertebrados foram feitas na ostra *C. virginica* por Casterline & Yip (1975) e no mexilhão *M. edulis* por Noël-Lambot (1976).

Na Tabela 1.15 encontram-se valores de concentração de MT determinados em estudos de campo e de laboratório em várias espécies de moluscos bivalves (total e/ou em diferentes tecidos). De uma forma geral, os teores desta proteína no total da parte edível varia entre 1 a 3 mg g⁻¹ de tecido seco, à excepção do mexilhão *M. galloprovincialis* que apresenta uma concentração de MT significativamente superior. Por outro lado, quando os diferentes órgãos são estudados separadamente, verifica-se que os teores de MT nos bivalves são superiores na glândula digestiva em relação às brânquias e restantes tecidos (Tabela 1.15).

1.2.5.1. Factores que Influenciam os teores de MTs nos organismos

A metalotionina sendo uma proteína induzida por metais é susceptível de responder quer aos diferentes factores que influenciam o metabolismo proteico quer a todos os factores que influenciam os teores metálicos, nomeadamente a estação do ano (Baudrimont *et al.*, 1997; Rainglet, 1998; Amiard *et al.*, 1998; Serra *et al.*, 1999; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999) e consequentemente os factores abióticos, como a temperatura e salinidade (Amiard-Triquet *et al.*, 1998b; Viarengo *et al.*, 1999b) e ainda os factores bióticos, como o peso, idade, sexo e estado de maturação do organismo (Bordin *et al.*, 1997; Mouneyrac *et al.*, 2000; Mouneyrac *et al.*, 1998; Amiard-Triquet *et al.*, 1998b; Olsson *et al.*, 1987; Hamza-Chaffai *et al.*, 1995).

Tabela 1.15 – Concentração de MT em diferentes tecidos de moluscos bivalves.

Espécie	Tecidos	Condição	Concentração MT (mg g ⁻¹ peso seco)	Referência
<i>Corbicula fluminea</i>	Total	<i>In situ</i>	1,25 - 2,5*	Rainglet, 1998
<i>Crassostrea gigas</i>	Gl. digestiva	"	5 - 7	Imber <i>et al.</i> , 1987
	Total	"	0,5 - 2*	Amiard-Triquet <i>et al.</i> , 1998b
	Brânquias	"	1,1*	Mouneyrac <i>et al.</i> , 1998
	Gl. digestiva	"	3,5*	"
	Resto	"	0,9 - 1,05*	"
	Brânquias	Laboratório (1)	0,5 - 0,85*	Géret, 2000
	Gl. digestiva	"	1,5 - 2,85*	"
	Manto	"	0,5 - 0,8*	"
	Brânquias	<i>In situ</i>	0,4 - 1,2*	Geffard <i>et al.</i> , 2002a
	Gl. digestiva	"	2 - 8*	Geffard <i>et al.</i> , 2001
<i>Macoma balthica</i>	Total	Laboratório (2)	1 - 14	Bordin <i>et al.</i> , 1997
	"	<i>In situ</i>	2,3 - 8,9	Amiard-Triquet <i>et al.</i> , 1998b
	"	Laboratório (3)	2,4 - 3,65*	Mouneyrac <i>et al.</i> , 2000
<i>Mya arenaria</i>	Brânquias	<i>In situ</i>	0,5 - 1*	Desbos, 1999
	Gl. digestiva	"	2,5 - 7*	"
<i>Mytilus edulis</i>	Total	Laboratório (400 µg Cd l ⁻¹)	2 - 9	Bebianno & Langston, 1991
	Total	<i>In situ</i>	2,5 - 3*	Amiard-Triquet <i>et al.</i> , 1998a
	Brânquias	"	1,5*	Amiard <i>et al.</i> , 1998
	Gl. digestiva	"	7,5 - 27,5*	"
	Brânquias	Laboratório (1)	0,85 - 3,5*	Géret, 2000
	Gl. digestiva	"	3,75 - 9,7*	"
	Manto	"	1,35 - 2,25*	"
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Total	Laboratório (400 µg Cd l ⁻¹)	3 - 12	Bebianno & Langston, 1992
	Gl. digestiva	"	10,5*	Pavicic <i>et al.</i> , 1993
	Total	<i>In situ</i>	3,9 - 13	Bebianno & Machado, 1997
	Brânquias	Laboratório (100 µg Cd l ⁻¹)	2 - 9	Bebianno & Serafim, 1998
	Total	"	4,25 - 6,25*	Raspor <i>et al.</i> , 1999
	Brânquias	"	2,25 - 3,25*	"
	Gl. digestiva	"	14,25 - 21,15*	"
<i>Ruditapes decussatus</i>	Total	Laboratório (400 µg Cd l ⁻¹)	1 - 2	Bebianno <i>et al.</i> , 1993
	Brânquias	"	2 - 4	"
	Gl. digestiva	"	5 - 6	"
	Brânquias	Laboratório (100 µg Cd l ⁻¹)	2 - 3,5	Bebianno & Serafim, 1998
	Gl. digestiva	<i>In situ</i>	15 - 30*	Hamza-Chaffai <i>et al.</i> , 1999
	Brânquias	"	1 - 4,5	Bebianno <i>et al.</i> , 2000
	Gl. digestiva	"	2,5 - 7	"
	Resto	"	2 - 5,5	"

(*) Valores calculados considerando um teor em água de 80% uma vez que as concentrações estavam indicadas em relação ao peso fresco

(1) Contaminação com Ag (20 µg l⁻¹), Cd (200 µg l⁻¹), Cu (40 µg l⁻¹), Hg (20 µg l⁻¹) e Zn (1000 µg l⁻¹).

(2) Contaminação com Cd (100 µg l⁻¹), Cu (100 µg l⁻¹) e Zn (600 µg l⁻¹).

(3) Contaminação com Cd (10 µg l⁻¹), Hg (100 µg l⁻¹) e Ag (10 e 50 µg l⁻¹).

1.2.6. METALOTIONINA COMO BIOMARCADOR

A determinação da concentração de MT tem sido proposta como biomarcador de exposição metálica, em várias espécies de moluscos bivalves, devido ao carácter indutível da síntese desta proteína pelos metais e ao aumento da sua concentração de forma proporcional à concentração dos metais no meio (Cosson & Amiard, 2000).

Segundo Stegeman *et al.* (1992), a utilização da MT como biomarcador em bivalves, deve seguir cinco critérios:

1. Capacidade de prevenir precocemente um estado de poluição;
2. Especificidade para um contaminante ou para uma classe de contaminantes;
3. Resposta dependente das flutuações dos níveis de contaminantes no ambiente;
4. Conhecimento dos factores endógenos e exógenos que podem afectar o indicador, de forma a minimizar fontes de variação não controladas;
5. Os níveis do indicador devem estar relacionados com o estado de saúde do organismo.

Segundo os critérios acima referidos, a MT foi proposta como biomarcador de exposição metálica em várias espécies de moluscos bivalves (Tabela 1.16). No entanto, na amêijoia *R. decussatus*, a qual é alvo deste estudo, alguns destes critérios não são conhecidos, apesar de vários estudos de campo apontarem a utilização de MT como biomarcador em alguns tecidos desta espécie (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999).

Tabela 1.16 – Espécies de moluscos onde a MT foi proposta como biomarcador de exposição metálica.

Espécie	Referência
<i>Patella aspera</i>	Bebianno <i>et al.</i> , 2002
<i>Crassostrea gigas</i>	Imber <i>et al.</i> , 1987; Amiard-Trique <i>et al.</i> , 1998a; Mouneyrac <i>et al.</i> , 1998; Cosson, 2000
<i>Mytilus edulis</i>	Amiard-Triquet <i>et al.</i> , 1998a; Raspor <i>et al.</i> , 1999
<i>Macoma balthica</i>	Amiard-Triquet <i>et al.</i> , 1998b; Mouneyrac <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyganodon grandis</i>	Perceval <i>et al.</i> , 2002
<i>Corbicula fluminea</i>	Baudrimont <i>et al.</i> , 2003
<i>Ruditapes decussatus</i>	Hamza-Chaffai <i>et al.</i> , 1999; Bebianno <i>et al.</i> , 2000

1.3. OBJECTIVO DA TESE

A capacidade revelada pelos bivalves em acumular metais pesados fez com que estes tenham sido objecto de numerosos estudos, com a finalidade de os utilizar como indicadores biológicos. A amêijoia *R. decussatus*, tal como outros moluscos bivalves, parece satisfazer os requisitos de um organismo bioindicador. Entre as características que as tornam indicadores adequados ao controlo da contaminação, destacam-se as seguintes:

- a) A amêijoia *R. decussatus* é uma espécie sésil, com um período de vida longo (aproximadamente 8 anos), apresentando populações relativamente estáveis, o que permite amostragens repetidas o que possibilita a obtenção de informação acerca de alterações temporais nos níveis de contaminantes (Bryan *et al.*, 1985).
- b) Apresentam uma distribuição geográfica relativamente vasta, o que permite a comparação de dados entre diferentes locais. De facto, esta espécie está largamente repartida nas costas Atlânticas (de Inglaterra a Mauritânia) e no Mediterrâneo (Guelorget *et al.*, 1980). Em Portugal ocorre em vários locais, normalmente em zonas abrigadas da costa. São exemplos na costa oeste, a ria de Aveiro, lagoa de Óbidos, margem esquerda do Tejo, Tróia e imediações da foz do Sado; na costa meridional encontra-se nas proximidades de Portimão, ria de Alvor e ria Formosa. Em grande quantidade ocorre apenas na ria de Alvor e, principalmente na ria Formosa (Vilela, 1950).
- c) Toleram uma vasta gama de condições ambientais, incluindo níveis relativamente elevados de contaminantes. Esta amêijoia é capaz de acumular metais em concentrações elevadas, sem efeitos nocivos aparentes (Bebiano & Langston, 1993).
- d) Evidenciam elevados factores de bioconcentração de metais nos seus tecidos. Estudos sobre a cinética de bioacumulação de Cd em *R. decussatus* levaram à classificação deste molusco como uma espécie de elevada afinidade para este metal (Henry *et al.*, 1984).

- e) Fácil acesso aos locais de amostragem. É uma espécie bastante comum na zona intertidal e muitas vezes é cultivada em viveiros, como no caso da Ria Formosa, o que permite uma produção anual bastante considerável.
- f) Recolha e manutenção de amostras com procedimento simplificado. Esta espécie tem um tamanho aceitável para o processamento das amostras e por outro lado é resistente, o que permite o transporte e manuseamento dos organismos.
- g) É ainda de referir, que a amêijoia *R. decussatus* constitui um alimento de grande valor comercial, pelo que a medida de contaminantes nos seus tecidos assume extrema importância em termos de saúde pública.

Embora os trabalhos consagrados ao estudo da contaminação metálica em zonas costeiras utilizando a amêijoia *R. decussatus* sejam incontestavelmente reduzidos comparativamente com a utilização do mexilhão *M. edulis*, esta espécie de amêijoia, tal como referido anteriormente, apresenta uma série de características que a torna um organismo indicador adequado ao controlo da contaminação do ambiente em que se desenvolvem. Pelo que a utilização de biomarcadores como a MT nesta espécie, pode permitir uma detecção precoce deste tipo de contaminação.

No entanto, e apesar da MT fazer parte dos biomarcadores "estabelecidos" para serem utilizados nos programas de monitorização (UNEP/RAMOG, 1999), os diferentes factores que afectam a concentração de MT numa determinada espécie, podem ter mais ou menos importância e a estimativa da sua acção é necessária para uma melhor compreensão do papel destas proteínas e da sua utilização enquanto biomarcador de exposição metálica.

Desta forma, o principal objectivo do trabalho apresentado nesta dissertação pretende responder à seguinte questão:

De que forma poderá ser utilizada a MT como biomarcador de contaminação metálica na amêijoia *R. decussatus*?

Para responder a esta questão outras questões foram colocadas:

- (i) Qual a influência de factores endógenos e exógenos nos níveis de MT na amêijoia *R. decussatus*, como a sazonalidade e o sexo dos indivíduos?

Esta questão será abordada no Capítulo II e relaciona-se com os factores que podem influenciar o papel da MT nesta espécie, uma vez que a concentração de metais nos tecidos dos moluscos pode ser dependente das condições ambientais e fisiológicas dos indivíduos. Variações sazonais na concentração de metais de um determinado local pode dever-se frequentemente a alterações no peso dos tecidos. Esta alteração do peso pode ser de origem gametogénica, e isso indica que o ciclo reprodutivo dos organismos, em alguns casos, influencia significativamente a concentração de metais nos seus tecidos e consequentemente os níveis de MT.

- (ii) Qual a cinética de acumulação e de depuração de Cd, Cu e Zn e qual a resposta da MT nestes períodos, em diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus* exposta a concentrações conhecidas de cada um desses metais e à mistura dos mesmos?

Grande parte dos trabalhos desenvolvidos sobre o estudo da MT têm sido dirigidos, nos últimos anos, para a pesquisa da função destas proteínas na actividade biológica dos metais, uma vez que estes ligandos apresentam uma capacidade invulgar de coordenar diferentes quantidades de Cd, Cu e Zn. Assim, nos Capítulos III, IV e V serão apresentados os resultados da combinação da determinação dos níveis de MT com o estudo da distribuição subcelular destes metais em diferentes tecidos da amêijoia, de forma a obter um conhecimento sobre os processos de bioacumulação, transferência, armazenamento e eliminação dos diferentes metais. No Capítulo VI apresenta-se um estudo laboratorial resultante da exposição de organismos sujeitos à mistura dos diferentes metais (Cd, Cu e Zn), na tentativa de uma aproximação às condições naturais uma vez que as contaminações ambientais são polimetálicas.

No estudo sobre o efeito do Cd nos tecidos desta espécie e apesar de várias exposições a este metal terem sido testadas, com o intuito de estudar a variação da concentração de MT em consequência da sua exposição (Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Bebianno & Serafim, 1998; G  ret *et al.*, 2002), nunca foi estudada a distribui  o subcelular de Cd, de forma a conhecer a afinidade deste metal para os diferentes ligandos, e especificamente para a MT em organismos expostos a concentra  es mais próximas das detectadas em alguns ambientes naturais. Por outro lado, também se desconhece o comportamento da MT em processos de depura  o de Cd nesta espécie. Esta questão    muito importante, devido ao elevado tempo de meia vida deste metal nos tecidos dos moluscos, em contraste com os metais essenciais. Desta forma, o objectivo do Capítulo III    analisar o papel das MTs no processo de acumula  o e de elimina  o de Cd em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposi  o a duas concentra  es diferentes de Cd próximas do ambiente natural (4 e 40 $\mu\text{g l}^{-1}$), seguido por um período de depura  o.

Quanto ao efeito do Cu e Zn e embora estudos anteriores terem mostrado o envolvimento da MT em alguns tecidos desta espécie exposta a estes metais (Rom  o & Gnassia-Barelli, 1995; G  ret *et al.*, 2002; G  ret & Bebianno, 2004) a liga  o destes metais    MT nunca foi demonstrada, desconhecendo-se a sua distribui  o nos diferentes componentes da frac  o proteica de baixo peso molecular, na qual se encontra a MT.

Por outro lado, quando se pretende conhecer o comportamento desta proteína em processos de acumula  o e de depura  o de Cu, na amêijoia *R. decussatus* exposta a concentra  es subletais e/ou agudas torna-se necessário conhecer a concentra  o letal de Cu, a qual nunca foi testada nesta espécie. Desta forma, o capítulo IV tem como objectivo determinar a toxicidade de Cu na amêijoia *R. decussatus*, para posteriormente estudar o envolvimento da MT nos tecidos desta amêijoia exposta a dois tipos de contamina  o: subletal e aguda. Na exposi  o subletal também se pretende compreender o comportamento desta proteína no processo de depura  o deste elemento. E ainda, clarificar se este metal estará ligado    MT ou eventualmente a outras prote  inas constituintes da frac  o citosólica. Enquanto, que no Capítulo V pretende-se estudar o papel da MT na acumula  o e elimina  o de Zn em diferentes

tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição ao Zn com duas concentrações diferentes (100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$), seguido por um período de depuração. Os processos de acumulação e de eliminação de Zn, também foram acompanhados pelo estudo da distribuição de Zn pelas diferentes fracções subcelulares e pelos diversos componentes da fracção proteica de baixo peso molecular, de forma a concluir sobre a afinidade deste elemento para os distintos compartimentos celulares.

No Capítulo VI pretendeu-se analisar o papel das MTs no processo de acumulação simultâneo de Cd, Cu e Zn em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição a uma mistura metálica destes metais, na tentativa de uma aproximação do ambiente natural (mistura metálica), a qual permita conhecer a forma como os metais interactivam entre si e consequentemente a forma como são retidos nos diferentes tecidos destes organismos, quer ao nível da sua distribuição subcelular quer à sua ligação com a MT.

- (iii) De que de forma a MT se relaciona com os níveis de metais, numa população natural de amêijoas *R. decussatus*?

Com esta questão pretende-se validar os resultados obtidos anteriormente numa população natural, de forma a generalizar e concluir sobre a utilização desta proteína como biomarcador. O local seleccionado foi a Ria Formosa, devido à abundância desta espécie e dada a importância desta laguna, quer por constituir uma área de grande valor ecológico quer por desempenhar um papel muito importante no plano sócio-económico e ainda face à crescente degradação a que esta tem vindo a sofrer. Os resultados deste estudo serão descritos no Capítulo VII.

Estes estudos surgem da necessidade de controlar os níveis de contaminação ambiental em determinadas áreas de grande valor ecológico, como o caso do sistema lagunar da Ria Formosa, e ainda da necessidade de avaliar o efeito destes elementos em diferentes populações de organismos marinhos, nomeadamente em espécies de elevado valor comercial, como a amêijoia *R. decussatus*.

Capítulo II

VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONINA E DE METAIS NA GLÂNDULA DIGESTIVA DA AMÊIJOA *Ruditapes decussatus*: EFEITO SAZONAL E SEXUAL

Maria A. Serafim & Maria J. Bebianno, 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: Sex and Seasonal effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20(3)**: 544-532.

2.1. INTRODUÇÃO

Os organismos marinhos acumulam e integram metais nos seus tecidos, pelo que a sua utilização permite obter uma medida mais representativa de exposição química do que análises directas à água e/ou sedimento. Entre as espécies bentónicas, os moluscos bivalves são caracterizados por apresentarem a capacidade de acumular metais, em concentrações proporcionais às encontradas no meio marinho, pelo que estes organismos têm sido utilizados como indicadores de contaminação metálica (Pavicic *et al.*, 1987).

Os moluscos, particularmente os bivalves, têm assumido um papel importante na avaliação da contaminação a nível mundial. Isto é o resultado de vantagens estratégicas, tais como serem fáceis de recolher, terem uma ampla distribuição geográfica, serem relativamente sedentários e com um tamanho aceitável, e na maior parte dos casos elevada importância ecológica e económica. A utilização destas espécies como bioindicadores inclui uma série de estratégias de acumulação, regulação e imobilização de metais (Langston *et al.*, 1998).

A concentração e distribuição de metais nos tecidos de moluscos é altamente dependente de processos bioquímicos que ocorrem no interior das células. Estes envolvem a ligação a moléculas citosólicas solúveis, tais como a MT, que tamponizam os iões metálicos a nível intracelular. Ao combinar a determinação de MT com as alterações na distribuição dos metais nas células, pode obter-se um conhecimento mais preciso do impacto da contaminação metálica no ambiente aquático. Assim, estas proteínas têm sido propostas como biomarcadores para avaliar a contaminação metálica no ambiente (Langston *et al.*, 1998).

Para serem utilizadas como biomarcadores, as MTs têm de cumprir determinados requisitos: devem estar presentes para servir de sinal de aviso, devem ser específicos para um determinado contaminante ou grupo de contaminantes e devem responder a alterações das concentrações do contaminante no ambiente. Além disso, os factores endógenos e exógenos que afectam o marcador devem ser conhecidos, de modo que as fontes de variação aleatórias possam ser minimizadas e ainda o indicador deve estar

relacionado com o estado de saúde do organismo, como referido no Capítulo I (secção 1.2.6) (Stegeman *et al.*, 1992).

A amêijoia *R. decussatus* preenche a maior parte dos requisitos mencionados acima. Esta espécie é capaz de acumular metais essenciais e não essenciais nos seus tecidos, é comum na zona intertidal, é sésil e eurialina e apresenta um período de vida longo (Castro *et al.*, 1996; Bebianno & Serafim, 1998). Esta espécie foi seleccionada como bioindicador, com base na sua abundância na Ria Formosa (costa Sul de Portugal), permitindo uma avaliação temporal e espacial da contaminação ambiental, tanto a curto como a longo prazo. Além disso, esta espécie tem uma importância económica relevante nesta área, onde são produzidas 80% das amêijoas cultivadas em Portugal (Bebianno, 1995).

Nesta espécie, metais essenciais e não-essenciais, como o Cu e o Cd respectivamente, ligam-se e/ou induzem a síntese de proteínas citosólicas, termicamente estáveis e ricas em conteúdos cisteicos, conhecidas como metalotioninas (MT) (ver Capítulo I – secção 1.2), em diferentes tecidos (Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Bebianno & Serafim, 1998; Hamza-Chaffai *et al.*, 1998). A concentração de MT tem sido detectada em vários tecidos de *R. decussatus* (brânquias, glândula digestiva, restante parte edível e no organismo total) e os dados revelaram que a glândula digestiva apresenta os níveis de MT mais elevados, seguido das brânquias e restante parte edível. Na parte edível total a produção de MT é relativamente baixa (Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Hamza-Chaffai *et al.*, 1998).

A capacidade de indução e de sequestro de metais (tais como Cd, Cu, Zn e Hg) pela MT serviu de base para a utilização de MT como um biomarcador de exposição metálica no ambiente aquático (Roesijadi, 1994a; High *et al.*, 1997; Langston *et al.*, 1998). No entanto, a concentração de metais nos tecidos dos moluscos pode ser dependente das condições ambientais e fisiológicas dos indivíduos, e estes factores podem influenciar o papel da MT nestas espécies. Assim, antes da concentração de MT poder ser utilizada como biomarcador, de um modo regular em programas de monitorização, a influência dos factores bióticos (tais como idade e estado fisiológico entre outros) e variáveis abióticas têm de ser tidas em consideração.

A sazonalidade e o sexo dos indivíduos influenciam a concentração de MT ao nível da espécie e dos tecidos. Variações sazonais na concentração de metais de um determinado local pode dever-se frequentemente a alterações no peso dos tecidos, e não a uma variabilidade no conteúdo absoluto de metais. Estas alterações podem ser de origem gametogénica, e isso indica que o ciclo reprodutivo dos organismos, em alguns casos pode influenciar a concentração de metais nos seus tecidos (Lobel *et al.*, 1982; Widdows & Donkin, 1992). A concentração de metais e MT é dependente da estação do ano no mexilhão *M. galloprovincialis*. A concentração de MT nesta espécie atinge níveis elevados no período de reprodução (Maio a Junho) e decresce após o mês de Agosto. Estas alterações estão relacionadas com o ciclo reprodutivo (Serra *et al.*, 1999). Um aumento significativo foi igualmente observado na concentração de MT na glândula digestiva de uma população selvagem de *M. galloprovincialis*, no mar Mediterrâneo durante Junho e Julho, relacionada com uma actividade metabólica mais elevada no final da Primavera e no Verão (Viarengo *et al.*, 1997). Similarmente, na amêijoia *M. balthica*, a MT apresentou um padrão sazonal com níveis mais elevados no Inverno e mais baixos no Verão. Estas flutuações devem-se a alterações no peso corporal e também a uma maior sensibilidade aos metais durante o Inverno (Bordin *et al.*, 1997). Contrariamente no bivalve de água doce *P. grandis* não foram observadas flutuações específicas nos níveis de MT ao longo do tempo, quando transplantado para dois lagos diferentes (Couillard *et al.*, 1995 a,b). No entanto, foram observadas flutuações nos níveis de MT ao longo do ano em tecidos específicos da amêijoia *C. fluminea* (organismo total, brânquias, manto, pé com músculo aductor e massa visceral) provenientes de um ambiente não contaminado. Estas variações nos teores de MT foram independentes da acumulação de metal, mas estão directamente relacionadas com o ciclo reprodutivo, com uma concentração máxima de MT em Maio na massa visceral (incluindo a gónada). Analogamente, a influência da fase reprodutiva pode também influenciar os níveis de MT na glândula digestiva de *M. edulis* transplantados para um ambiente contaminado por Cd (Baudrimont *et al.*, 1997; Amiard-Triquet *et al.*, 1998a).

Entre todos os tecidos, a concentração mais elevada de metais e MT foi medida na glândula digestiva de *R. decussatus* (Bebiano *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Bebianno & Serafim, 1998). Assim, este tecido foi seleccionado para

estudar a influência do sexo e da sazonalidade na concentração de MT e metais (Cd, Cu e Zn) e confirmar se este tecido é o mais adequado para fins de monitorização nesta espécie.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Amêijoas *R. decussatus* (comprimento da concha $36 \pm 0,1$ mm) foram recolhidas mensalmente de Junho a Setembro (período de diferenciação sexual) em dois locais distintos da Ria Formosa (local A – $7^{\circ} 56' 25''$ W, $37^{\circ} 00' 44''$ N; local B – $7^{\circ} 57' 50''$ W, $36^{\circ} 59' 44''$ N) (Figura 2.1). O local A encontra-se directamente influenciado por fontes antrópicas (Figura 2.1 A), enquanto que o local B encontra-se afastado da influência urbana (Figura 2.1 B).

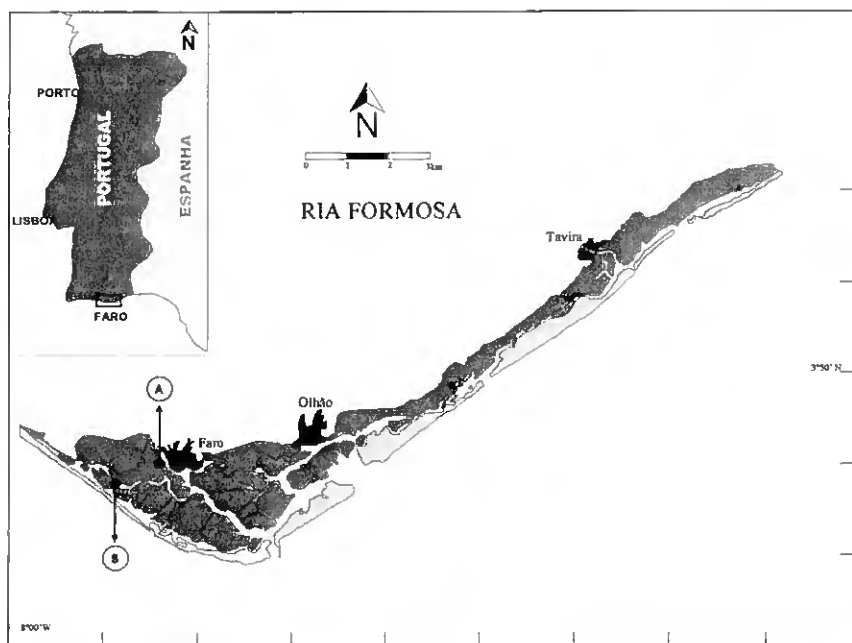


Figura 2.1 – Locais amostrados na Ria Formosa. A) Local directamente influenciado por fontes antrópicas; B) Local não influenciado por fontes antrópicas.

O sexo dos organismos foi determinado observando a gonóda por microscopia óptica. Após a identificação do sexo dos organismos, estes foram removidos da concha e a glândula digestiva dissecada.

II

Foram utilizados três replicados de amostras compostas de seis glândulas digestivas de machos e fêmeas separadamente. As glândulas digestivas, de cada um dos sexos, foram pesadas e homogeneizadas em três volumes de tampão Tris-HCl 0,02M (pH 8,6), num banho de gelo (4°C). Subamostras do homogeneizado foram utilizadas para a determinação da razão peso fresco/peso seco e da concentração total de metais. Outra aliquota do homogeneizado (3 ml) foi centrifugada a 30000 g durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi separado da fracção residual (FI), tratado termicamente a 80°C durante 10 minutos e re-centrifugado nas mesmas condições para precipitar os ligandos de elevado peso molecular (FEPM). As diferentes etapas de isolamento das distintas fracções subcelulares do tecido analisado, encontram-se esquematizadas na Figura 2.2.

A concentração de MT foi quantificada em aliquotas (50-250 µl) da fracção citosólica tratada termicamente por polarografia diferencial com impulsos, como descrito por Bebianno & Langston (1989). A quantificação desta proteína foi baseada na metalotionina de fígado de coelho MT-1 (solução de trabalho: 10 mg l⁻¹ em água destilada), devido à inexistência de um padrão de MT de amêijoia. A análise de metais (Cd, Cu e Zn) foi efectuada em subamostras secas do homogeneizado total e da fracção citosólica tratada termicamente (FBPM) por espectrofotometria de absorção atómica, após digestão com ácido nítrico em forno de microondas. A qualidade dos resultados foi assegurada pela análise de metais em padrões certificados como o TORT I de hepatopâncreas de lagosta (National Research Council Canada). Os dados obtidos (média ± σ) foram 26,0 ± 1,1 µg g⁻¹ para o Cd, 449 ± 0,04 µg g⁻¹ para o Cu e 160 ± 0,7 µg g⁻¹ para o Zn comparado com os valores certificados de 26,3 ± 2,1 µg g⁻¹, 439 ± 22 µg g⁻¹ e 177 ± 10 µg g⁻¹, respectivamente.

A concentração de MT e de metais está expressa em nmol g⁻¹ de peso seco do tecido inicialmente homogeneizado. Para expressar a MT em nmol g⁻¹, foi utilizado o peso molecular de 7328 Da determinado na glândula digestiva de *R. decussatus* (Simes *et al.*, 2003).

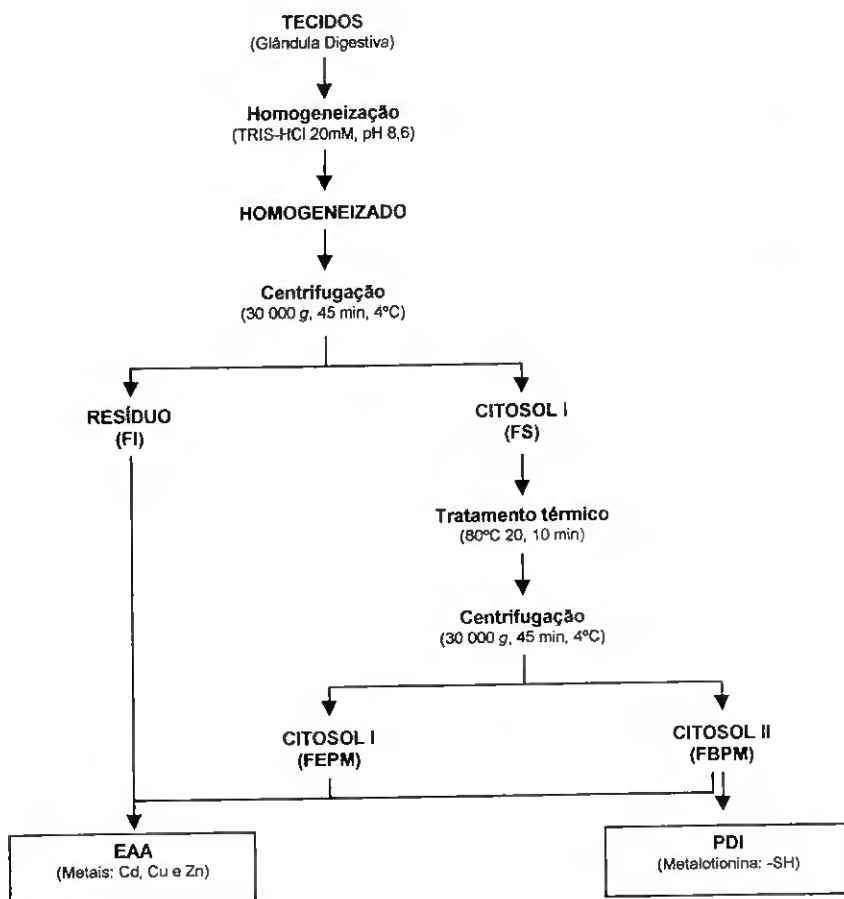


Figura 2.2 -- Esquema representativo do método de separação das diferentes frações subcelulares (FI - fração insolúvel; FS - fração solúvel; FEPM - fração proteica de elevado peso molecular; FBPM - fração proteica de baixo peso molecular). (EAA - Espectrofotometria de Absorção Atômica; PDI - Polarografia Diferencial com Impulsos).

Para determinar a variabilidade dos dados aplicou-se a análise de variância (ANOVA). Quando foram observadas diferenças significativas entre as médias utilizou-se o teste de Duncan ($p < 0,05$), para descriminar as diferenças. A estes dados também foram aplicadas análises de regressão (linear e múltipla), para um nível de significância de 0,05.

2.3. RESULTADOS

A concentração de MT na glândula digestiva das amêijoas *R. decussatus* recolhida em dois locais distintos (A e B) da Ria Formosa, durante o período de diferenciação sexual, encontra-se na Figura 2.3.

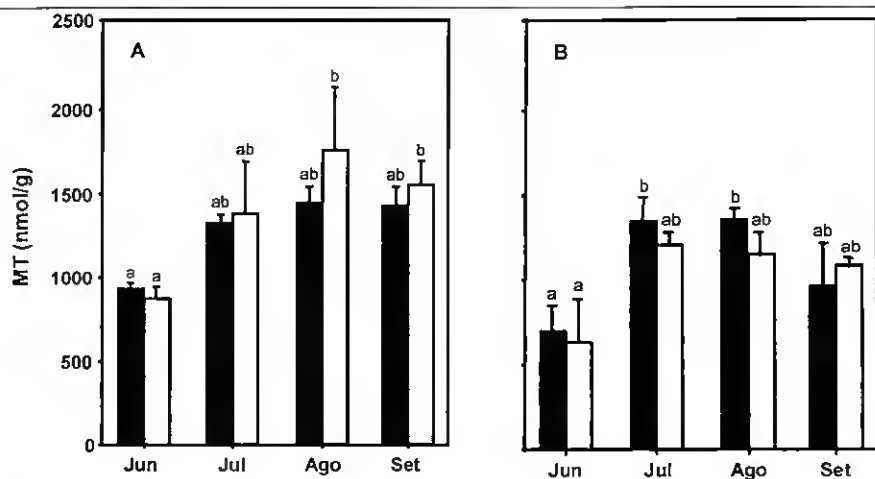


Figura 2.3 – Concentração de metalotionina (MT) na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus*, durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) nos locais A e B da Ria Formosa (■ Machos; □ Fêmeas).

(Os dados representam média \pm σ para $n=6$ e os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)).

Os teores de MT foram mais baixos no mês de Junho em ambos os locais amostrados, não existindo diferenças significativas entre os sexos dos organismos ($p > 0,05$) (Figura 2.3). No local com influência antrópica (Local A) a concentração de MT aumentou linearmente de Junho a Agosto ($MT \text{ (nmol/g)} = 968 + 8,6 t \text{ (dias)}$ ($r = 0,872$) nos machos e $MT \text{ (nmol/g)} = 896 + 14,6 t \text{ (dias)}$ ($r = 0,664$) nas fêmeas), nestes meses também não foram observadas diferenças significativas entre os sexos dos organismos ($p > 0,05$) (Figura 2.3A). No mês de Agosto os níveis de MT atingiram os valores máximos de $1441 \pm 98 \text{ nmol g}^{-1}$ nos machos e de $1750 \pm 378 \text{ nmol g}^{-1}$ nas fêmeas (Figura 2.3A). No local B os teores desta proteína foram significativamente inferiores comparativamente com o local A (Figura 2.3), no entanto, aumentaram

significativamente de Junho para Julho e permaneceram constantes de Julho até Setembro (Figura 2.3B). A análise estatística revelou que os teores de MT na glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* não são dependentes do sexo dos organismos. Embora, tenham sido observadas variações significativas na concentração de MT entre os locais e os meses amostrados ($p < 0,05$).

A concentração de Cd, Cu e Zn total e na fracção subcelular tratada termicamente (FBPM) da glândula digestiva das amêijoas recolhidas na Ria Formosa, durante o período de diferenciação sexual encontram-se na Tabela 2.1 e Figura 2.4.

Tabela 2.1 – Concentração de Cd, Cu e Zn (nmol g^{-1} tecido seco) na glândula digestiva da amêijoia *Ruditapes decussatus* nos locais A e B da Ria Formosa (média $\pm \sigma$, n=6).

	LOCAL A				LOCAL B			
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas	
	Total	FBPM	Total	FBPM	Total	FBPM	Total	FBPM
Cd								
Jun	4,89 \pm 0,12	2,67 \pm 0,26	4,80 \pm 0,25	2,82 \pm 0,15	5,53 \pm 0,19	2,97 \pm 0,39	7,01 \pm 0,73	2,97 \pm 0,74
Jul	10,1 \pm 1,91	6,38 \pm 1,99	10,5 \pm 0,24	5,78 \pm 0,77	6,12 \pm 0,08	4,15 \pm 0,15	7,50 \pm 1,44	4,89 \pm 1,18
Ago	12,9 \pm 1,67	7,86 \pm 1,41	11,7 \pm 0,86	6,38 \pm 0,39	7,56 \pm 0,27	4,30 \pm 0,15	7,46 \pm 0,45	5,78 \pm 0,77
Set	6,20 \pm 0,39	3,56 \pm 0,44	6,81 \pm 0,45	4,15 \pm 0,54	6,69 \pm 0,52	2,67 \pm 0,51	8,20 \pm 0,25	2,97 \pm 0,39
MÉDIA	8,53 \pm 1,10	5,12 \pm 0,83 (60%)	8,44 \pm 0,86	4,78 \pm 0,47 (57%)	6,48 \pm 0,26	3,52 \pm 0,26 (54%)	7,54 \pm 0,38	4,15 \pm 0,51 (55%)
Cu								
Jun	396 \pm 32,7	163 \pm 0,77	329 \pm 17,4	172 \pm 22,9	239 \pm 36,3	90,3 \pm 4,26	228 \pm 34,0	87,9 \pm 3,29
Jul	480 \pm 21,4	234 \pm 41,2	442 \pm 11,7	180 \pm 13,1	246 \pm 16,8	112 \pm 6,04	178 \pm 6,46	85,0 \pm 4,82
Ago	400 \pm 34,6	192 \pm 21,3	530 \pm 115	264 \pm 1,36	273 \pm 5,44	126 \pm 6,56	276 \pm 10,0	140 \pm 4,37
Set	376 \pm 36,9	164 \pm 14,0	435 \pm 28,1	198 \pm 19,5	235 \pm 7,05	117 \pm 4,16	229 \pm 8,87	113 \pm 2,78
MÉDIA	413 \pm 18,2	188 \pm 13,5 (46%)	434 \pm 33,5	203 \pm 13,0 (47%)	248 \pm 9,82	111 \pm 4,56 (45%)	228 \pm 13,1	106 \pm 6,89 (46%)
Zn								
Jun	1308 \pm 26,1	200 \pm 3,00	1377 \pm 1,23	178 \pm 20,6	1142 \pm 95,1	202 \pm 9,57	1158 \pm 79,7	163 \pm 53,0
Jul	1379 \pm 5,72	160 \pm 19,0	1413 \pm 26,1	179 \pm 92,0	1097 \pm 5,68	120 \pm 14,0	1230 \pm 42,2	149 \pm 20,2
Ago	1509 \pm 132	285 \pm 16,6	1708 \pm 64,7	241 \pm 14,3	1023 \pm 22,0	124 \pm 8,84	907 \pm 74,9	125 \pm 9,70
Set	1709 \pm 415	335 \pm 16,8	1668 \pm 189	342 \pm 87,9	1108 \pm 69,5	130 \pm 14,1	1097 \pm 20,1	87,1 \pm 11,9
MÉDIA	1476 \pm 104	245 \pm 21,7 (17%)	1541 \pm 61,8	235 \pm 34,2 (15%)	1093 \pm 28,8	144 \pm 11,3 (13%)	1098 \pm 44,1	131 \pm 15,3 (12%)

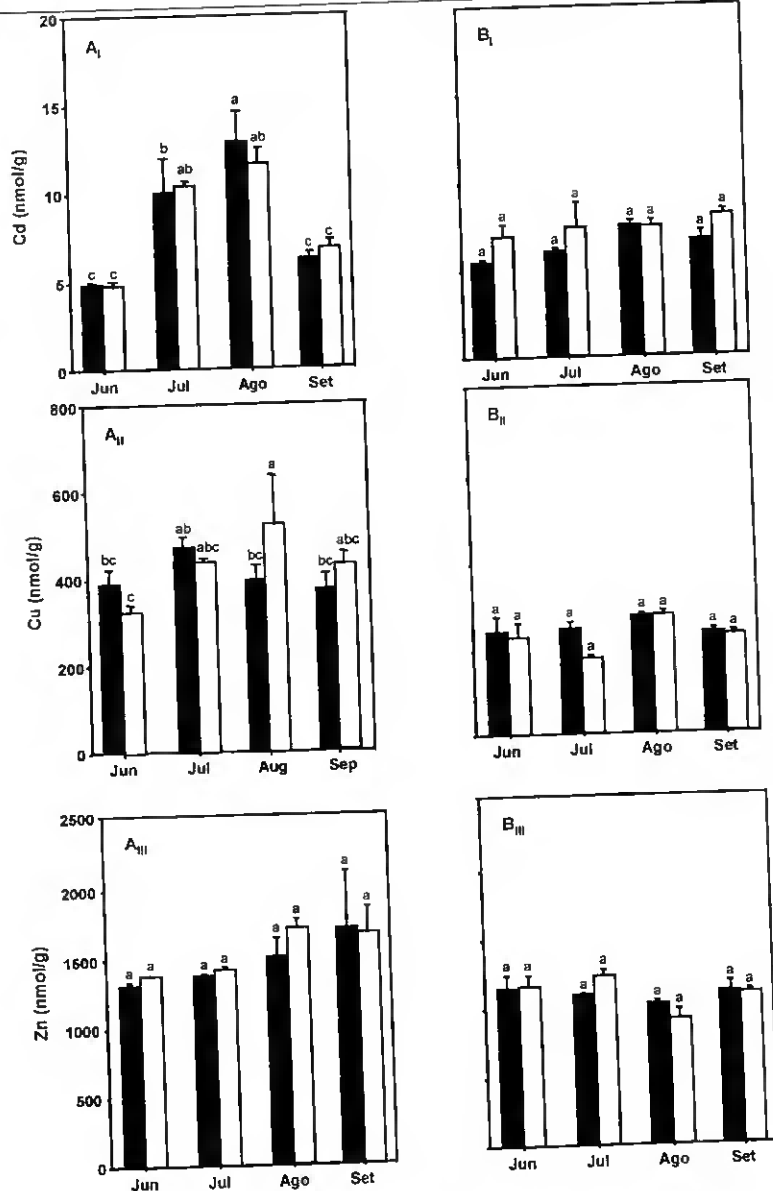


Figura 2.4 – Concentração total de Cd, Cu e Zn na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus* durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) nos locais A e B da Ria Formosa: (A_I) Cd total no local A; (B_I) Cd total no local B; (A_{II}) Cu total no local A; (B_{II}) Cu total no local B; (A_{III}) Zn total no local A; (B_{III}) Zn total no local B. (■ Machos; □ Fêmeas). (Os dados representam média \pm σ para n=6 e os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)).

Entre os três metais analisados (Cd, Cu e Zn), o Zn apresentou as concentrações mais elevadas seguidas do Cu e por último o Cd, quer total quer na fracção subcelular FBPM (Tabela 2.1 e Figura 2.4). No entanto, na fracção subcelular FBPM embora a mesma relação se mantenha, estes metais apresentam afinidades distintas. O Cd nesta fracção subcelular representa mais de 50% da concentração total (57% nos machos e 56% nas fêmeas), correspondendo à fracção subcelular com a maior concentração deste metal.

Por outro lado, o Cu nesta fracção subcelular (FBPM) corresponde a menos de 50% do Cu total (45% nos machos e 47% nas fêmeas), enquanto que os níveis de Zn foram significativamente mais baixos, representando apenas cerca de 15% do Zn total (15% nos machos e 14% nas fêmeas). Contudo, no local com influência antrópica (Local A) a quantidade de metal na fracção subcelular FBPM é geralmete mais elevada do que no local mais afastado da zona urbana (Local B), embora esta percentagem só seja significativa para a concentração de Cd nos machos ($p < 0,05$) (Tabela 2.1).

A variação da concentração de Cd na glândula digestiva, dos machos e das fêmeas, no local A (Tabela 2.1 e Figura 2.4A₁), reflecte o mesmo padrão da concentração de MT (Figura 2.3A). Tal como para a MT, a concentração total de Cd aumentou significativamente entre Junho e Agosto, em ambos os sexos (Cd_{Total} (nmol g⁻¹) = $5,28 + 0,134 t$ (dias) ($r = 0,837$) nos machos e Cd_{Total} (nmol g⁻¹) = $5,56 + 0,114 t$ (dias) ($r = 0,906$) nas fêmeas). Contudo os coeficientes angulares destas relações lineares não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). No entanto, e contrariamente à concentração de MT, a concentração de Cd diminuiu significativamente entre Agosto e Setembro (Tabela 2.1 e Figura 2.4 A₁), o mesmo comportamento foi observado para a concentração de Cd na fracção subcelular FBPM (Tabela 2.1), embora com teores de Cd mais baixos (Cd_{FBPM} (nmol g⁻¹) = $3,04 + 0,086 t$ (dias) ($r = 0,714$) nos machos e Cd_{FBPM} (nmol g⁻¹) = $3,21 + 0,059 t$ (dias) ($r = 0,848$) nas fêmeas). A concentração de Cd mais elevada foi no mês de Agosto, no local A e em ambos os sexos, quer no total do tecido ($12,9 \pm 1,7$ nmol g⁻¹ nos machos e $11,7 \pm 0,9$ nmol g⁻¹ nas fêmeas) quer na fracção FBPM ($7,9 \pm 1,4$ nmol g⁻¹ nos machos e $6,4 \pm 0,4$ nmol g⁻¹ nas fêmeas), não existindo diferenças significativas na concentração deste elemento entre os sexos ($p > 0,05$) (Tabela 2.1).

No local B, a concentração total de Cd não foi significativamente diferente nos meses amostrados, tendo com um valor médio de $7,00 \pm 0,25 \text{ nmol g}^{-1}$ ($p > 0,05$) (Figura 2.4 B_I). Contudo, a concentração de Cd na fracção subcelular FBPM durante o período de diferenciação sexual mostrou o mesmo padrão que no local A, isto é, a concentração de Cd aumentou de Junho para Agosto em ambos os sexos (Cd_{FBPM} (nmol g^{-1}) - $3,14 + 0,022 \text{ t (dias)}$ ($r = 0,779$) nos machos e Cd_{FBPM} (nmol g^{-1}) - $3,14 + 0,047 \text{ t (dias)}$ ($r = 0,657$) nas fêmeas), decrescendo posteriormente entre Agosto e Setembro (Tabela 2.1).

Analogamente à concentração de MT, a concentração de Cd (total e FBPM) na glândula digestiva das amêijoas foi significativamente diferente entre locais ($p < 0,05$), mas não entre sexos ($p > 0,05$). A análise estatística revelou também que, a concentração de Cd (total e FBPM) foi dependente da sazonalidade no local A, enquanto que no local B a concentração total de Cd não foi afectada pela sazonalidade (Tabela 2.1 e Figura 2.4 A_I e B_I).

A concentração de Cu na glândula digestiva das amêijoas, no local A, mostrou um comportamento inverso entre os machos e as fêmeas durante o período de diferenciação sexual (Tabela 2.1 e Figura 2.4 A_{II}). Nos machos os níveis de Cu (total e fracção subcelular FBPM) decresceram de Julho para Setembro (Cu_{Total} (nmol g^{-1}) - $523 - 1,731 \text{ t (dias)}$ ($r = 0,672$) e Cu_{FBPM} (nmol g^{-1}) - $266 - 1,157 \text{ t (dias)}$ ($r = 0,581$)) enquanto que nas fêmeas a concentração aumentou de Junho para Agosto (Cu_{Total} (nmol g^{-1}) - $334 + 3,35 \text{ t (dias)}$ ($r = 0,649$) e Cu_{FBPM} (nmol g^{-1}) - $160 + 1,53 \text{ t (dias)}$ ($r = 0,819$)). Apesar desta tendência, só existem diferenças significativas na concentração de Cu entre machos e fêmeas no mês de Agosto na concentração total de Cu e nos meses de Julho e Agosto na fracção subcelular FBPM ($p < 0,05$) (Figura 2.4 A_{II}). No local B, a concentração total de Cu não foi afectada significativamente pelos meses amostrados, em ambos os sexos ($p > 0,05$), tendo sido observada uma concentração média de Cu de $238 \pm 8,29 \text{ nmol g}^{-1}$ (Figura 2.4 B_{II}). A concentração de Cu na fracção FBPM nas fêmeas foi significativamente superior no mês de Agosto relativamente aos outros meses ($p < 0,05$) (Figura 2.4 B_{II}).

Quando se analisam todas as amostras em conjunto, existem diferenças significativas entre a concentração de Cu na glândula digestiva das amêijoas nos dois locais amostrados ($p < 0,05$).

A distribuição da concentração de Zn (total e FBPM) na glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* foi distinta da dos outros dois metais (Cd e Cu) (Tabela 2.1 e Figura 2.4). No local com influência antrópica (Local A) a concentração total de Zn aumentou de Junho a Setembro, atingindo uma concentração máxima de 1709 ± 415 nmol g⁻¹ nos machos e 1668 ± 159 nmol g⁻¹ nas fêmeas (Tabela 2.1). No entanto, a concentração deste elemento, em ambos os sexos, não apresentou diferenças significativas entre os meses amostrados ($p > 0,05$) (Figura 2.4 A_{III}). A concentração de Zn na fracção subcelular FBPM, a qual representa apenas 15% da concentração total de Zn, também apresenta valores máximos no mês de Setembro no local A, em ambos os sexos (Tabela 2.1). No local B a concentração de Zn (total e FBPM) não apresentou alterações significativas, quer entre os diferentes meses amostrados, quer entre os sexos dos organismos ($p > 0,05$) (com valores médios de Zn de $1095 \pm 25,8$ nmol g⁻¹ no total e de $138 \pm 9,37$ nmol g⁻¹ na fracção subcelular FBPM) (Tabela 2.1 e Figura 2.4 B_{III}).

Tal como para os teores de MT e dos outros dois metais, a concentração de Zn na glândula digestiva das amêijoas foi significativamente diferente entre os locais amostrados ($p < 0,05$), mas não entre os sexos dos organismos ($p > 0,05$).

Se a concentração dos três metais (Cd, Cu e Zn) for adicionada (Figura 2.5), verifica-se que a concentração total dos metais (TMe) no local A, aumentou de Junho a Setembro nos machos (TMe_{Total} (nmol g⁻¹) = $1726 \pm 3,56$ t (dias) ($r = 0,522$)) atingindo um valor máximo de 2091 ± 441 nmol g⁻¹, enquanto nas fêmeas o TMe aumentou de Junho a Agosto (TMe_{Total} (nmol g⁻¹) = $1673 \pm 8,97$ t (dias) ($r = 0,877$)), atingindo um valor máximo de 2249 ± 130 nmol g⁻¹, decrescendo posteriormente no mês de Setembro (Figura 2.5 A_I). Na fracção subcelular FBPM o TMe aumentou linearmente de Junho a Setembro, em ambos os sexos (TMe_{FBPM} (nmol g⁻¹) = $364 \pm 1,65$ t (dias) ($r = 0,742$) nos machos e TMe_{FBPM} (nmol g⁻¹) = $335 \pm 2,40$ t (dias) ($r = 0,612$) nas fêmeas) (Figura 2.5 A_{II}).

II

No local B o TMe (Total e FBPM) não mostrou diferenças significativas, quer entre os sexos quer entre os diferentes meses amostrados ($p > 0,05$) (concentrações médias de $1340 \pm 21,0$ nmol g⁻¹ no total e $250 \pm 8,63$ nmol g⁻¹ na FBPM) (Figura 2.5 B_I e B_{II}). No entanto, a soma dos três metais (Total e FBPM) na glândula digestiva das amêijoas recolhidas na Ria Formosa durante o período de reprodução sexual foi significativamente inferior no local B comparativamente com o local A ($p < 0,05$) (Figura 2.5).

Uma vez que não existem diferenças significativas entre sexos para os teores de MT e metais na glândula digestiva das amêijoas, os dados foram analisados em conjunto (machos e fêmeas). Quando os dados foram trabalhados em conjunto detectou-se uma relação linear significativa entre a concentração de MT e a soma dos metais (Total e FBPM) (Figura 2.6 a e b).

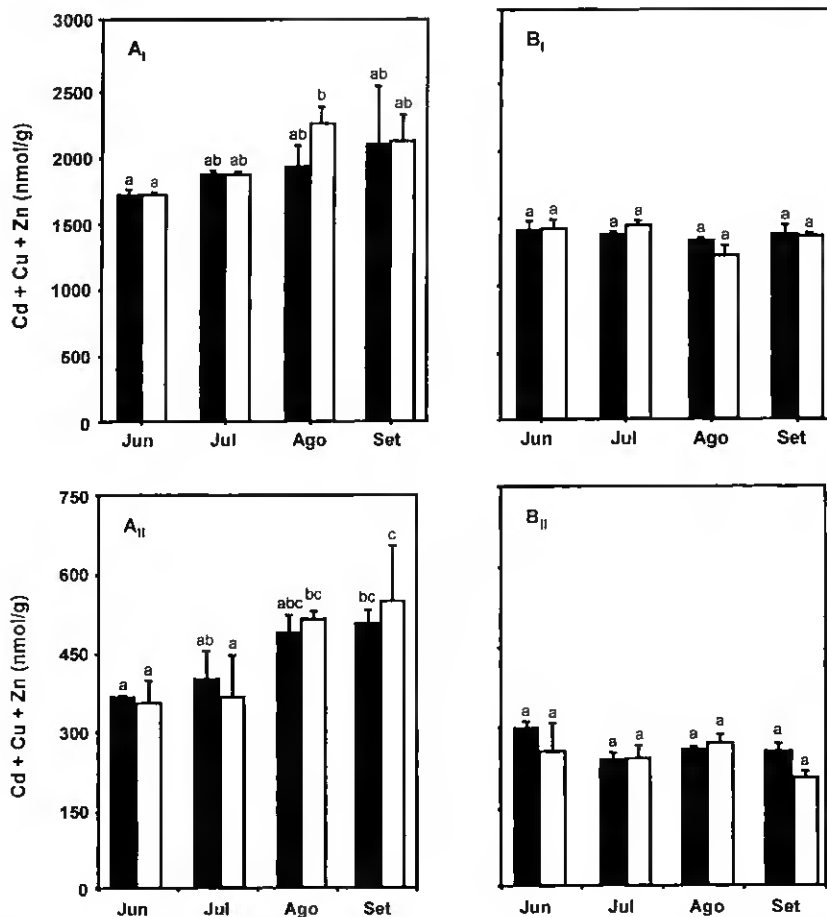


Figura 2.5 – Soma da concentração de Cd, Cu e Zn (TME) (Total e FBPM) na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus* durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) nos locais A e B da Ria Formosa: (A_I) TME total no local A; (B_I) TME total no local B; (A_{II}) TME na FBPM no local A; (B_{II}) TME na FBPM no local B. (■ Machos □ Fêmeas).

(Os dados representam média \pm σ para n=6 e os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)).

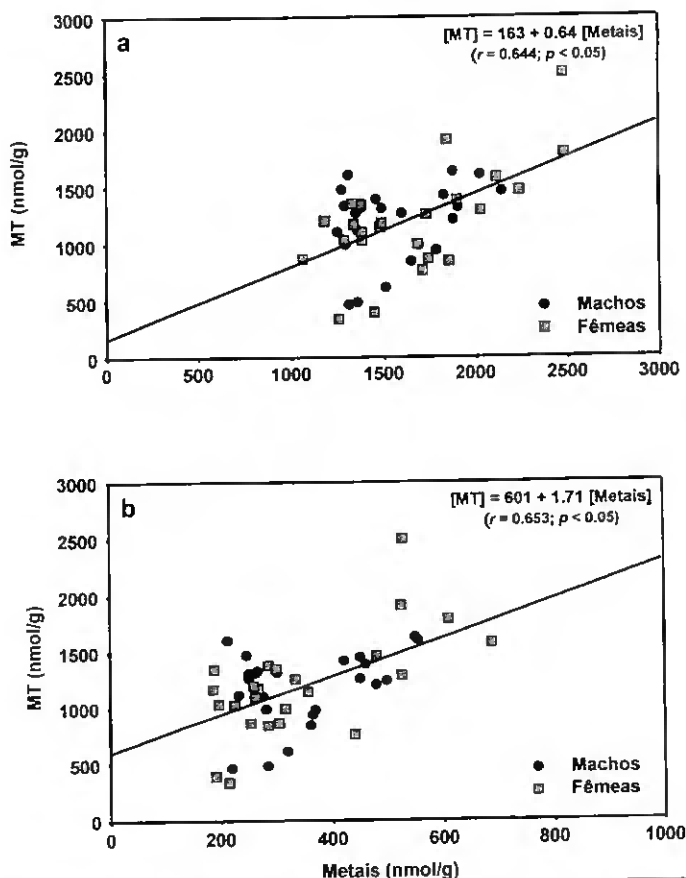


Figura 2.6 -- Relação entre a concentração de MT e a soma da concentração de Cd, Cu e Zn (TMe) na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus*, durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) na Ria Formosa: (a) Total; (b) FBPM.

Com o objectivo de comparar a importância relativa de cada metal na ligação à MT, foi aplicada aos dados uma análise de regressão múltipla, em que a concentração de MT foi expressa em função da concentração dos metais em estudo: $MT = f(Cd, Cu, Zn)$. Os modelos obtidos entre a concentração de MT e dos metais (Total e FBPM) encontram-se na Tabela 2.2. A significância de cada coeficiente encontra-se entre parêntesis. Verificou-se que a concentração de Cu foi a que mais afectou a concentração de MT, seguida do Cd, enquanto que os níveis de Zn não afectaram a concentração desta proteína. As análises de regressão mostraram que o Cu e o Cd

sozinhos contribuíram com 36 e 30% respectivamente, para a variação dos teores de MT. Por outro lado, na fracção subcelular FBPM o Cd foi o metal que mais afectou a concentração de MT, seguido pelo Cu e por último o Zn. A análise de regressão, mostrou que o Cd sozinho explicou 57% da variação da concentração de MT, enquanto o Cu conseguiu explicar 42% e o Zn somente 21%.

Tabela 2.2 - Relação entre a concentração de MT e a concentração de metais (total e FBPM) na glândula digestiva da amêijoia *Ruditapes decussatus*

Total	(n = 48, r = 0,684)
	MT = 312 + 31,5 Cd + 1,36 Cu + 0,142 Zn (p=0,028) (p=0,01) (p=0,480)
FBPM	(n = 48, r = 0,799)
	MT = 483 + 57,7 Cd + 1,31 Cu + 1,35 Zn (p=0,005) (p=0,013) (p=0,024)

(nos parênteses encontra-se o nível de significância de cada um dos coeficientes).

Quando os metais foram tratados separadamente observou-se uma relação linear significativa entre a concentração de MT e as concentrações totais de Cd e Cu, mas não de Zn. Enquanto que na fracção subcelular FBPM foi observada uma relação linear significativa entre a concentração de MT e os três metais separadamente (Figura 2.7), embora o Zn parecesse estar menos relacionado com a MT do que os outros metais.

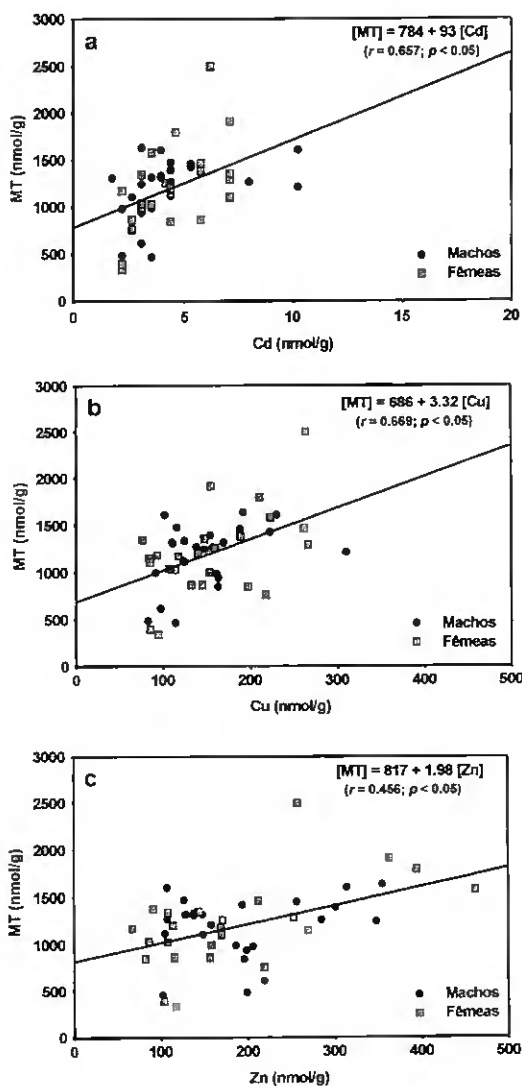


Figura 2.7 – Relação entre a concentração de MT e a concentração de cada metal (Cd, Cu e Zn) na fração subcelular FBPM da glândula digestiva de machos e fêmeas de *Ruditapes decussatus*, durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro) na Ria Formosa: (a) Cd; (b) Cu; (c) Zn.

2.4. DISCUSSÃO

Quando se considera a utilização da MT como uma resposta bioquímica (biomarcador) de contaminação metálica numa população de amêijoas *R. decussatus*, deve ser estudada a influência do sexo principalmente durante o período de diferenciação sexual e o efeito da variação sazonal na relação entre metais e MT. Além disso, os organismos devem ser calibrados para evitar o efeito do tamanho, e os níveis de base da MT devem ser conhecidos.

A ausência de uma relação significativa entre a concentração de MT (Figura 2.3), Cd, Cu e Zn (na fracção total e FBPM) e o sexo dos organismos obtida neste estudo (Tabela 2.1 e Figura 2.4) é consistente com os resultados de outros estudos em que foram utilizados moluscos. No mexilhão *M. edulis* e no gastrópode *L. littorea*, não existem correlações entre a concentração de metal e o sexo dos organismos (Lobel *et al.*, 1982). Também na glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus*, recolhida na Costa Tunisina, o sexo não afectou as concentrações de metal. No entanto, foram detectadas diferenças significativas entre os níveis de MT e o sexo no mês de Julho, com concentrações de MT nas fêmeas superiores à dos machos, o que indica que nesta população de amêijoas outros factores que não a concentração metálica afectam a síntese de MT (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999).

A discrepância entre os níveis de MT no presente estudo de campo e os reportados para a mesma espécie de amêijoia recolhida na Tunísia no mês de Julho (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999), pode ser devido ao facto das fêmeas da população de amêijoia da Tunísia se encontrarem na fase de emissão de gametas, terem perdido peso, e terem índice de condição baixo quando comparado com os machos (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999). Isto não foi observado na população de amêijoas da Ria Formosa.

Na ostra *C. virginica* não existe evidência de nenhuma relação entre a ligação de metais à MT e ao estado fisiológico, embora possam ocorrer algumas alterações na ligação do Cd e do Cu às MTs como resultado do estado reprodutivo e da época do ano (Roesijadi, 1994a).

Durante o período de diferenciação sexual (Junho a Setembro), os níveis de MT, Cd (em ambos os sexos) e Cu (nas fêmeas), aumentaram de Junho a Agosto, com um

subsequente decréscimo no mês de Setembro, no local com influência antrópica (Figuras 2.3A e 2.4A_I e A_{II}). Por outro lado, os machos atingiram um máximo de concentração de Cu em Julho, diminuindo em Agosto e Setembro, enquanto que não foram observadas variações sazonais nos teores de Zn, em ambos os sexos e locais (Figuras 2.4A_{II} e A_{III}). Estes dados reforçam a capacidade destas amêijoas de regular as concentrações deste metal essencial que desempenha importante função biológica. Os resultados obtidos para as concentrações de MT, Cd (em ambos os sexos), e Cu (nas fêmeas), são da mesma ordem de grandeza das encontradas na glândula digestiva da mesma espécie noutros trabalhos, onde a concentração de MT e metais também aumenta linearmente de Junho a Agosto (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999).

O padrão de variação sazonal no local A é semelhante ao de variação da temperatura da água na Ria Formosa, que atinge um máximo em Agosto (23°C), diminuindo para 20°C em Setembro (dados não apresentados) (Falcão & Vale, 1998). Apesar da temperatura ser considerada um dos factores abióticos mais importantes, que influencia a taxa de filtração a incorporação de metais e a indução de MT (Serra *et al.*, 1999), a temperatura não parece influenciar a concentração de MT no presente estudo. De facto, a concentração de metais e MT no local B não apresenta o mesmo padrão do local A, e as alterações de temperatura não são particularmente significativas ao longo da Ria Formosa (Falcão & Vale, 1998). As diferenças entre a concentração de metais e de MT nos dois locais, são explicadas pela sua diferente localização em relação à contaminação metálica. O local A é directamente influenciado por fontes antrópicas, o mesmo não acontece no local B (Bebiano, 1995; Falcão & Vale, 1998).

O TMe segue o mesmo padrão da concentração de MT em ambos os locais durante o período de diferenciação sexual (Figuras 2.3 e 2.5). No local A (com influência antrópica), tal como os teores de MT, a soma da concentração dos metais (Figuras 2.3A, 2.5A_I e A_{II}) apresenta uma tendência crescente de Junho a Agosto e diminui em Setembro. Estes resultados, neste local, podem estar relacionados com um aumento da introdução de metais nos meses de Verão (Julho e Agosto) uma vez que, nesta lagoa costeira ocorrem grandes flutuações na população durante este período, que pode atingir um aumento de cerca de 10 vezes (Bebiano & Serafim, 1998). No local B

(sem influência antrópica) durante o mesmo período, a concentração total dos três metais, bem como a concentração de MT são significativamente inferiores e não apresentam nenhuma variação sazonal (Figuras 2.3B e 2.5B_I e B_{II}). A MT neste caso está provavelmente associada com o seu papel na regulação e na homeostasia de metais essenciais.

Além disso, as variações sazonais da concentração de metais também não estiveram relacionadas com alterações no peso dos organismos uma vez que o padrão de variação de metais e MT foi diferente nos dois locais.

Na amêijoia de água doce *C. fluminea* e na amêijoia de água salobra *M. balthica* a concentração de MT no total da parte edível atingiu um máximo em Maio, imediatamente antes ao período de desova e correspondendo ao desenvolvimento máximo da gónada (Baudrimont *et al.*, 1997; Bordin *et al.*, 1997). No presente trabalho, apenas foi utilizada a glândula digestiva (sem gónada), de forma a evitar flutuações de peso relacionado com a diferenciação sexual. Noutras espécies (como o *M. galloprovincialis*) durante a gametogénese os tecidos desenvolvem-se envolvendo a glândula digestiva, criando intrusões no interior desta, o que pode levar à alteração do peso total da glândula digestiva e consequentemente à diminuição da concentração metálica (Regoli, 1998). No entanto, nesta amêijoia este tipo de intrusões de tecido gonadossomático no interior da glândula digestiva não ocorre, pelo que a sua dissecação é relativamente fácil.

A relação entre a concentração de MT e a soma da concentração dos diferentes metais (total e FBPM) é linear e significativa (Figura 2.6), sugerindo que esta proteína desempenha um papel fundamental no transporte e armazenamento de metais, desempenhando também um papel protector contra o efeito tóxico destes metais, sequestrando-os e reduzindo a concentração destes metais como iões metálicos livres (Halmiton & Merle, 1986).

A principal proporção de Cd e Cu total em ambos os sexos foi encontrada na fracção subcelular tratada termicamente (FBPM) da glândula digestiva das amêijoas (Tabela 2.1). Estes resultados sugerem que, a maior parte do Cd e do Cu na fracção citosólica está ligada à MT. Este facto, é apoiado pela existência de uma relação

II

linear significativa entre a concentração de MT e a concentração destes dois metais no total e na fracção FBPM (Figura 2.7 a e b). Em contraste, só uma pequena porção de Zn total (<15%) foi encontrada na FBPM (Tabela 2.1), sugerindo que este metal se encontra preferencialmente ligado a outras proteínas, tais como lipoproteínas (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995). No entanto, existe uma relação linear significativa entre a concentração de MT e a concentração de Zn na fracção FBPM (Figura 2.7 c), apesar de menos significativa quando comparada com a de Cd e Cu. O mesmo padrão de distribuição de Zn foi também observado em laboratório, onde amêijoas *R. decussatus* foram expostas a estes metais (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995).

Numa população natural de ostra *C. virginica*, a partição entre Cd, Cu e Zn no citosol também apresentou um padrão de variação sazonal e espacial específico. Nesta população natural de ostras, a concentração de MT ligada aos metais pode ser prevista a partir da concentração de metais no citosol, mas não a partir da concentração total de cada um destes metais (Roesijadi, 1994a). No presente trabalho esta previsão pode também ser feita para ambas as concentrações (total e citosólica) na glândula digestiva de *R. decussatus* para o Cd e o Cu, enquanto que para o Zn apenas a partir da fracção citosólica.

Os resultados obtidos neste Capítulo reforçam a ideia que a MT na amêijoia *R. decussatus* surge como uma resposta natural à concentração metálica, em que a concentração desta proteína aumenta com o aumento dos níveis de metais. Tal como acontece noutras espécies de bivalves, tais como o mexilhão *M. galloprovincialis* (Serra *et al.*, 1999), a amêijoia *M. balthica* (Bordin *et al.*, 1997) e a ostra *C. gigas* (Mouneyrac *et al.*, 1998), os níveis desta proteína aumentam com o aumento da contaminação metálica presente no ambiente. Assim, mesmo em populações naturais a MT é uma resposta significativa à exposição metálica e pode servir como um marcador de aviso precoce para avaliar um "estado toxicológico" de *R. decussatus* em ambientes contaminados por metais. O aumento dos metais sequestrados pela MT pode reflectir a utilização desta proteína como um mecanismo de desintoxicação de exposição metálica nesta espécie de amêijoas.

Por outro lado, os resultados obtidos mostraram que o sexo dos organismos não influencia os teores de MT na glândula digestiva de *R. decussatus*, pelo que a

amostragem deste bivalve, com a finalidade de monitorização ambiental, pode ser efectuada aleatoriamente e independentemente do sexo dos organismos. A determinação de MT na glândula digestiva de *R. decussatus* pode ser utilizada como biomarcador de contaminação metálica.

Capítulo III

CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO E DE DEPURAÇÃO DE CÁDMIO NOS TECIDOS DA AMÊIJOA *Ruditapes decussatus*: RESPOSTA DA METALOTIONINA

3.1. INTRODUÇÃO

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.3. RESULTADOS

3.4. DISCUSSÃO

3.1. INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal utilizado em diferentes processos industriais e representa um dos maiores poluentes aquáticos na água e nos sedimentos (Zelikoff *et al.*, 1996). Tal como referido no Capítulo I (secção 1.1.2.1), este elemento é um dos metais mais tóxicos (Wittmann, 1981; Langston, 1990; Luoma & Carter, 1991; Chelomin *et al.*, 1995; Brzóska & Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Choi *et al.*, 2001). Os efeitos tóxicos que este metal exerce sobre os organismos incluem efeitos nefrotóxicos, carcinogénicos e tetarogénicos e toxicidade endócrina e reprodutiva (Olabarrieta *et al.*, 2001). Este metal também pode provocar a degradação das membranas celulares, através de duas vias: (i) pela ligação de Cd à MT e à glutatona, ambas com uma função antioxidante, e desta forma interferindo com a capacidade destas proteínas de evitar o stress oxidativo e/ou (ii) pela substituição de metais essenciais como o Cu e o Zn em enzimas antioxidantes, alterando a conformação destas enzimas e afectando a sua actividade, uma vez que este elemento interacciona de forma ubíqua com os grupos sulfidril de aminoácidos, proteínas e enzimas (Giguère *et al.*, 2003).

Desta forma, o efeito tóxico deste metal está relacionado com alterações ao nível dos processos fisiológicos e bioquímicos normais dos organismos, que não são facilmente detectáveis. Consequentemente, estudos consagrados à identificação de biomarcadores moleculares (ou índices de stress) podem ser úteis para detectar alterações a nível molecular causadas pelo Cd antes que efeitos tóxicos adversos ocorram. Neste contexto, a metalotionina (MT) e a MT-ARNm são considerados importantes biomarcadores na detecção recente de exposição a Cd (Roesijadi, 1996; 2000).

O mecanismo pelo o qual a MT pode proteger a célula contra a toxicidade do Cd, consiste no sequestro de iões de Cd livres formando um complexo Cd-MT inactivo, com a consequente alteração da distribuição subcelular de Cd (Goering & Klaassen, 1983; Park *et al.*, 2001). Geralmente é assumido que a MT tem um papel importante na homeostasia de metais a nível celular, por um lado como armazenamento de metais essenciais e por outro na desintoxicação de alguns metais essenciais e não essenciais. Após um aumento dos níveis de metal a nível intracelular, ocorre uma rápida activação na transcrição de MT-ARNm, e um aumento na síntese de MT, a

qual se vai ligar aos metais que se encontram livres na célula (Langston *et al.*, 1998). De facto, vários estudos em moluscos marinhos mostram que a inducibilidade de MT após a exposição ao excesso de metais confirma que esta proteína desempenha um papel crucial na desintoxicação destes metais (Roesijadi, 1992; Bebianno & Langston, 1995; Dusquesne *et al.*, 1995; Leung & Furness, 1999, 2001).

A detecção de MTs em várias espécies de moluscos bivalves, após a exposição ao Cd tem vindo a ser extensivamente documentada, desde que as primeiras MTs em invertebrados foram descritas na ostra *C. virginica* e no mexilhão *M. edulis* em meados dos anos 70 (compilados nos artigos de revisão: Roesijadi, 1992; Viarengo & Nott, 1993; Mason & Jenkins, 1995; Langston *et al.*, 1998) (ver Capítulo I – secção 1.2.1.1). Recentemente, vários trabalhos também mostraram o aumento da síntese de MT após a exposição ao Cd, nomeadamente na ostra *C. virginica* exposta a 100 µg Cd l⁻¹ durante 28 dias (Engel, 1999), nas brânquias e na glândula digestiva da ostra *C. gigas* ao fim de 21 dias de exposição a 200 µg Cd l⁻¹ (Géret *et al.*, 2002), nas brânquias do mexilhão *M. edulis* exposto à mesma concentração e durante o mesmo período de tempo (Géret *et al.*, 2002) e no mexilhão *M. galloprovincialis* quer em diferentes tecidos expostos a 500 µg Cd l⁻¹ durante 7 dias (Serra *et al.*, 1999) quer nas brânquias ao fim de 34 dias de exposição a 100 µg Cd l⁻¹ (Serafim *et al.*, 2002).

Tal como outros moluscos bivalves, a amêijoia *R. decussatus* acumula metais reflectindo o grau de contaminação no meio exterior (Henry *et al.*, 1982; Henry *et al.*, 1984; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000; Serafim & Bebianno, 2001; Bebianno & Serafim, 2003 – ver Capítulos II e VII). Estudos experimentais da cinética de acumulação de Cd em vários tecidos de *R. decussatus* revelaram que esta espécie apresenta grande afinidade para este metal (Henry *et al.*, 1982; Vicente *et al.*, 1988; Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Bebianno & Serafim, 1998), mas para uma concentração de $7,03 \pm 3$ mg Cd l⁻¹ (LC₅₀ 96h 14°C) este metal é letal (Henry *et al.*, 1984). Recentemente esta espécie foi proposta como boa bioindicadora dos níveis ambientais de Cd e os níveis de MT como possível biomarcador da contaminação provocada por este metal (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000; Serafim & Bebianno, 2001).

Estudos efectuados anteriormente, demonstraram que os níveis de MT na amêijoia *R. decussatus* após a exposição ao Cd, podem ser determinados directamente por Polarografia Diferencial com Impulsos (PDI), sem ser necessário recorrer a técnicas cromatográficas para separar os componentes da fracção citosólica. Os autores mostraram que a maior percentagem de grupos tiólicos eluídos da fracção citosólica tratada termicamente correspondia à MT e que a resposta polarográfica aumentava com o tempo e a concentração da exposição (Bebiano *et al.*, 1993). Mais recentemente, foram encontradas quatro isoformas de MT associadas ao Cd na glândula digestiva de *R. decussatus*, no entanto a sequência do NH₂-terminal só foi conclusiva em duas delas (Simes *et al.*, 2003). Os resultados obtidos por estes autores evidenciaram a existência de polimorfismo nesta espécie, tal como foi descrito na MT de mexilhão, sendo esta uma característica comum nas MTs dos invertebrados (Mackay *et al.*, 1993).

Foram efectuadas várias exposições com Cd (4, 40, 100, 250, 400 e 500 µg Cd l⁻¹) usando esta espécie de amêijoia, com o intuito de estudar a variação da concentração de MT em consequência da exposição a este metal, verificando-se que houve indução desta proteína, e que essa indução depende da concentração, do tempo de exposição e dos tecidos analisados (Bebiano *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Bebiano & Serafim, 1998; Gêret *et al.*, 2002). No entanto, nas concentrações mais próximas das detectadas em alguns ambientes naturais, nunca foi analisada a distribuição subcelular de Cd nos tecidos de *R. decussatus*, de forma a conhecer a afinidade deste metal para os diferentes ligandos e especificamente para a MT. Por outro lado, também se desconhece o comportamento da MT em processos de depuração de Cd nesta espécie. Esta questão é muito importante, devido ao elevado tempo de permanência deste metal nos tecidos desta espécie, em contraste com os metais essenciais (Gnassia-Barelli *et al.*, 1995). Este fenómeno, pode reflectir que os processos de desintoxicação relativamente aos metais essenciais e não essenciais podem ser explicados, em parte, por diferentes comportamentos da MT (Viarengo, 1989; Maroni, 1990; Mersch *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1999; Baudrimont *et al.*, 2003).

O objectivo deste capítulo é analisar o papel das MTs no processo de acumulação e de eliminação de Cd em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição a Cd

com duas concentrações diferentes e mais próximas do ambiente natural (4 e 40 $\mu\text{g l}^{-1}$) durante 40 dias, seguido por um período de depuração (50 dias).

Os processos de acumulação e de eliminação foram seguidos em condições controladas na tentativa de ajustar modelos cinéticos que permitam determinar coeficientes, para uma melhor previsão, comparação e compreensão dos mecanismos associados aos diferentes tecidos e exposições. Esta aproximação foi feita na tentativa de responder às seguintes questões:

(i) Qual a cinética de acumulação de Cd nos diferentes tecidos de *R. decussatus* e de que forma esta pode ser influenciada por diferentes exposições? Como pode a indução de MT influenciar essa cinética?

(ii) Qual a cinética de depuração deste metal nos diferentes tecidos após as duas exposições e o que acontece à MT induzida no processo de depuração?

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Amêijoas *R. decussatus* (30-35 mm), recolhidas na Ria Formosa, num local afastado de fontes antrópicas, foram transportadas para laboratório e depuradas durante 7 dias. Após este período, as amêijoas foram expostas durante 40 dias a duas concentrações de Cd. Assim, lotes de 60 indivíduos foram colocados em 9 aquários, com um volume de 10 litros. Três aquários serviram de controlo experimental, três foram contaminados com cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck) numa concentração de $4 \mu\text{g l}^{-1}$ e outros três com uma concentração de $40 \mu\text{g l}^{-1}$. Decorrido o período de exposição, os exemplares foram transferidos para água sem Cd durante mais cinquenta dias.

Durante as experiências foi medida a temperatura ($18,3 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$), a salinidade ($37,3 \pm 0,5 \text{ ‰}$), o pH ($8,1 \pm 0,03$) e a percentagem de saturação de oxigénio (superior a 70%).

Retiraram-se aleatoriamente, sem reposição, amostras de seis indivíduos por aquário (controlo e contaminados), ao fim de 0, 7, 14, 21, 30, 40 dias (no período de acumulação) e nos dias 50, 60, 75 e 90 (no período de depuração).

Os organismos foram dissecados separando-se as brânquias, a glândula digestiva e a restante parte do corpo (manto, pé e músculos adutores). O processamento de cada um dos tecidos seguiu o tratamento descrito no Capítulo II (secção 2.2 – Figura 2.2), em amostras compostas de seis tecidos.

Foi determinada a concentração de Cd no homogeneizado total e nas diferentes fracções subcelulares: fracção residual (FI), fracção proteica de elevado peso molecular (FEPM), e fracção proteica de baixo peso molecular (FBPM). A determinação da concentração deste metal foi realizada após um pré-tratamento por via húmida, que consistiu na secagem das amostras com posterior digestão com HNO_3 supra puro numa placa de aquecimento estabilizada a 100°C até completa destruição da matéria orgânica. Posteriormente as amostras foram retomadas numa solução de

HCl 10%. Após este procedimento o doseamento de Cd foi efectnado por Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA) com chama ou câmara de grafite.

Os teores de MT foram determinados na fracção FBPM, por polarografia diferencial com impulsos através do método descrito por Bebianno & Langston (1989).

A validação da concentração de Cd nas amostras foi efectuada recorrendo a materiais de referência, nomeadamente tecido de ostra (NBS) (National Institute of Standards & Technology) em que os valores certificados são $4,15 \pm 0,38 \mu\text{g g}^{-1}$ comparativamente com valores determinados de $4,09 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$.

As concentrações de Cd e de MT estão expressas em nmol por grama de tecido seco inicialmente homogeneizado ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Foi utilizado o peso molecular de 7328 Da (peso molecular determinado para a glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* (Bebianno *et al.*, 2000; Simes *et al.*, 2003)).

3.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variabilidade das concentrações de Cd e de MT ao longo do tempo foi testada nos diferentes tecidos através da análise de variância (ANOVA) a três entradas, considerando como variáveis independentes o tempo, a concentração de Cd a que os organismos foram expostos e o tecido. Para discriminar as diferenças entre cada uma das variáveis foi utilizado o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Foram também efectuadas análises de regressão, quer entre as concentrações de Cd e de MT com o tempo, quer entre as concentrações de MT e de Cd, para um nível de significância de 0,05.

Aos dados de acumulação e de eliminação de Cd nos tecidos foi aplicado um modelo cinético de 1ª ordem, em que a bioconcentração de Cd pode ser expressa como um balanço entre os processos de assimilação e de depuração deste elemento, através da seguinte equação:

$$C_B = K_a/K_d C_W (1 - e^{-kdt})$$

Em que,

C_B corresponde à concentração de Cd no tecido do organismo (nmol g^{-1});

C_W à concentração de Cd na água a que o organismo está exposto (nmol ml^{-1});

K_a à taxa constante de assimilação (d^{-1});

K_d à taxa constante de depuração (d^{-1}).

As taxas K_a e K_d foram calculadas através da análise de regressão não-linear com o método de estimação Simplex e quasi-Newton. O cálculo destas constantes permite posteriormente determinar o factor de bioconcentração (BCF), uma vez que esta equação prevê que C_B atinja um estado estacionário com o decorrer do tempo, desta forma t continua a aumentar ($t \rightarrow \infty$) até $(1 - e^{-K_e t}) = 0$, nestas condições $C_B = K_a/K_e C_W$, em o que o BCF = $C_B/C_W = K_a/K_e$.

Durante o período de eliminação, em que os organismos foram transferidos para água não contaminada ($C_W = 0$), este modelo assume a seguinte equação:

$$C_B = C_{B0} e^{-K_e t}$$

Em que,

C_{B0} corresponde à concentração inicial de Cd no período de depuração (nmol g^{-1});

K_e à taxa de eliminação durante o período de depuração (d^{-1}).

O cálculo de K_e permite determinar o tempo de meia vida do metal ($t_{1/2}$) que corresponde à razão $\ln 2/K_e$.

¹ Assume-se $C_W = 0$ embora possa existir uma pequena concentração de Cd na água utilizada

3.3. RESULTADOS

3.3.1. CONCENTRAÇÃO DE Cd NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

A concentração (média $\pm \sigma$) de Cd (nmol g⁻¹) total e nas diferentes frações subcelulares (FI, FEPM e FBPM) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a 4 e 40 µg l⁻¹ de Cd ao fim de 40 dias de exposição e de 50 dias de depuração (dia 90), encontra-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Concentração de Cd (nmol g⁻¹) (total e nas diferentes frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a 4 e 40 µg Cd l⁻¹, ao fim de 40 dias de exposição e de 50 de depuração.

	Controlo	4 µg l ⁻¹ Cd		40 µg l ⁻¹ Cd	
		Acumulação (40º dia)	Eliminação (90º dia)	Acumulação (40º dia)	Eliminação (90º dia)
Brânquias					
Total	5,57 ± 1,41	165 ± 18	72,9 ± 7,29	687 ± 69,9	131 ± 15,2
FI	1,39 ± 0,37 (27)	25,8 ± 0,26 (18)	17,4 ± 0,17 (17)	183 ± 16,7 (26)	28,9 ± 3,6 (26)
FEPM	1,51 ± 0,42 (29)	22,8 ± 2,30 (16)	20,7 ± 2,02 (20)	81,2 ± 8,11 (12)	19,0 ± 2,9 (17)
FBPM	2,25 ± 0,62 (44)	98,3 ± 15,4 (66)	64,7 ± 5,04 (63)	405 ± 31,3 (62)	64,1 ± 10,7 (57)
Gl. digestiva					
Total	30,1 ± 7,89	340 ± 34,0	257 ± 26,0	1811 ± 165	979 ± 100
FI	4,48 ± 0,95 (15)	65,7 ± 5,57 (20)	79,1 ± 8,01 (21)	695 ± 70,0 (33)	212 ± 19,9 (23)
FEPM	9,58 ± 1,52 (32)	78,0 ± 8,07 (24)	97,3 ± 10,0 (26)	232 ± 22,4 (11)	110 ± 10,7 (12)
FBPM	15,7 ± 5,19 (53)	184 ± 19,6 (56)	203 ± 8,02 (53)	1200 ± 72,5 (56)	587 ± 65,6 (65)
Resto					
Total	2,58 ± 0,72	31,5 ± 2,99	8,72 ± 1,02	216 ± 22,0	234 ± 23,3
FI	0,95 ± 0,20 (27)	11,3 ± 1,25 (26)	6,76 ± 1,68 (35)	88,3 ± 9,01 (35)	65,0 ± 7,05 (32)
FEPM	1,38 ± 0,31 (39)	14,1 ± 2,01 (32)	6,94 ± 1,60 (36)	61,1 ± 6,30 (24)	50,8 ± 6,31 (26)
FBPM	1,19 ± 0,45 (34)	18,6 ± 0,60 (42)	5,43 ± 1,42 (29)	105 ± 6,67 (41)	82,7 ± 11,8 (42)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de Cd em cada uma das frações subcelulares.

Os teores de Cd (total e nas frações subcelulares) não variaram significativamente nos três tecidos das amêijoas não contaminadas, ao longo do ensaio experimental ($p > 0,05$) (Tabela 3.1). O tecido onde os teores de Cd foram mais elevados foi a glândula digestiva (5 vezes superior ao das brânquias e 12 vezes superior ao da restante parte do corpo), existindo diferenças significativas entre as concentrações de Cd de todos os tecidos ($p < 0,05$).

Relativamente à distribuição subcelular de Cd nos tecidos das amêijoas não contaminadas (Tabela 3.1), verificou-se na fracção FBPM uma percentagem de Cd significativamente superior à das outras fracções nas brânquias (44%) e na glândula digestiva (53%), enquanto que no resto dos tecidos é na fracção FEPM que os teores de Cd são mais elevados (39%). No entanto, a concentração de Cd nesta fracção não foi significativamente diferente da observada na fracção FBPM (34%) ($p < 0,05$). Assim, observa-se para cada tecido a seguinte distribuição subcelular de Cd: FBPM > FEPM \approx FI nas brânquias; FBPM > FEPM > FI na glândula digestiva e FEPM \approx FBPM > FI na restante parte do corpo (Tabela 3.1).

Todos os resultados relativos às concentrações de Cd nos diferentes tecidos encontram-se em anexo (Tabelas A.1, A.2 e A.3).

3.3.1.1. Acumulação de Cd

Na Figura 3.1 apresenta-se a evolução da concentração de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a Cd (4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração.

A concentração total de Cd nas brânquias das amêijoas expostas a 4 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Figura 3.1-A_I), aumentou linearmente durante todo o período de exposição, com uma velocidade de acumulação de 3,8 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r = 0,967$; $p < 0,05$). A mesma evolução da concentração deste elemento foi observada na fracção FBPM (2,0 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$, $r = 0,913$; $p < 0,05$). Por outro lado, nas fracções subcelulares FI e FEPM, os teores de Cd apenas aumentaram linearmente até ao 21º dia de exposição, com velocidades de acumulação relativamente inferiores às observadas no total e na fracção FBPM (FI: 1,4 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r = 0,992$; $p < 0,05$); FEPM: 1,3 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r = 0,985$; $p < 0,05$)).

Os teores de Cd nas brânquias das amêijoas expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.1-A_{II}), apresentaram um comportamento distinto, ou seja, apesar da concentração total de Cd ter aumentado linearmente até ao 30º dia de exposição com uma velocidade de acumulação significativamente superior à das amêijoas expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ (22,3 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$, $r = 0,995$; $p < 0,05$), após este período os níveis de Cd não se alteraram ($673 \pm 20 \text{ nmol g}^{-1}$). Enquanto que, os teores de Cd acumulados nas diferentes fracções

subcelulares aumentaram linearmente até ao fim do período de exposição, à excepção da fracção FEPM, em que os teores não sofreram qualquer alteração significativa a partir do 14º dia de exposição ($83,4 \pm 13,3 \text{ nmol g}^{-1}$). A velocidade de acumulação de Cd nestas fracções foi significativamente superior à das amêijoas expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ (FBPM: $10,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,993$; $p < 0,05$); FI: $4,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,981$; $p < 0,05$); FEPM: $5,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,962$; $p < 0,05$)).

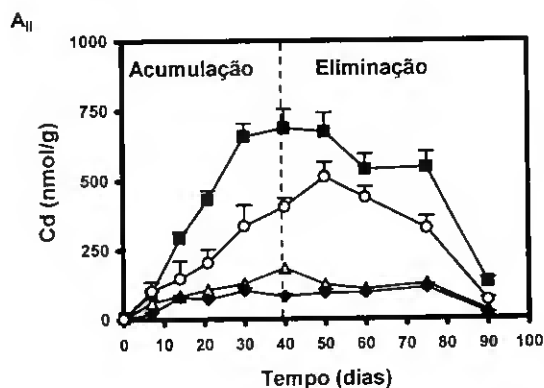
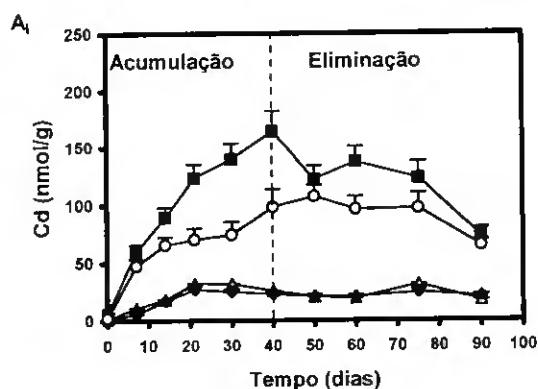


Figura 3.1 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ (I) e a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (II) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração. (■ Total; △ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM).

Duma forma geral, nas brânquias expostas quer a 4 quer a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cd (Figura 3.1-A_I e A_{II}), a velocidade de acumulação deste metal difere em cada uma das

fracções subcelulares, verificando-se que a fracção FBPM apresenta uma velocidade significativamente superior comparativamente com as fracções FI e FEPM, entre as quais não existem diferenças significativas quando expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ ($p < 0,05$).

A acumulação de Cd na glândula digestiva durante o período de exposição foi distinta da observada nas brânquias. A concentração de Cd (total e nas fracções subcelulares) aumentou exponencialmente durante todo o período de exposição, nas amêijoas expostas a ambas as concentrações de Cd (Figura 3.2 - A_I e A_{II} e Tabela 3.2).

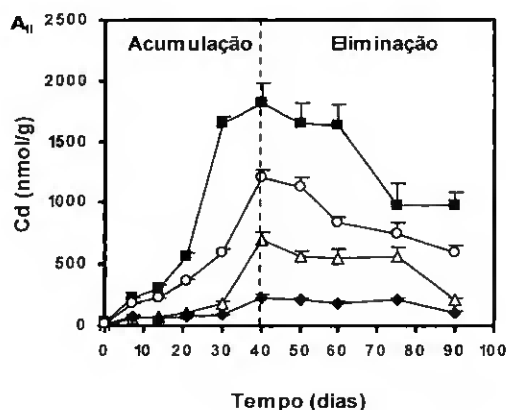
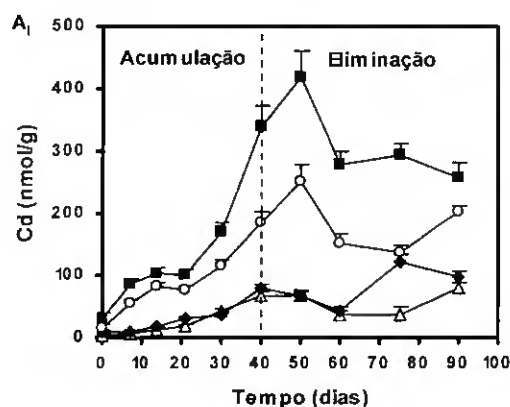


Figura 3.2 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e fracções subcelulares) na glândula digestiva das amêijoas expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ (I) e a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (II) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração.

(■ Total; △ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM)

Tabela 3.2 – Ajuste exponencial aos dados de acumulação de Cd na glândula digestiva das amêijoas expostas a 4 e $40 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, durante 40 dias.

	4 $\mu\text{g l}^{-1}$		40 $\mu\text{g l}^{-1}$	
	Equação	r	Equação	r
Total	$\text{Cd} = 33 e^{0,06 t}$	0,920	$\text{Cd} = 52 e^{0,10 t}$	0,920
FI	$\text{Cd} = 4 e^{0,07 t}$	0,993	$\text{Cd} = 10 e^{0,11 t}$	0,920
FEPm	$\text{Cd} = 9 e^{0,05 t}$	0,979	$\text{Cd} = 23 e^{0,06 t}$	0,847
FBPM	$\text{Cd} = 18 e^{0,07 t}$	0,852	$\text{Cd} = 29 e^{0,11 t}$	0,867

Tal como nas brânquias, o incremento difere em cada uma das exposições, sendo superior na glândula digestiva das amêijoas expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ comparativamente com a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($p < 0,05$). Relativamente à evolução da acumulação de Cd nas fracções subcelulares, verifica-se que em ambas as exposições, as fracções FI e FBPM sofrem um incremento superior comparativamente com os teores de Cd na fracção FEPm (Tabela 3.2).

À semelhança das brânquias, a restante parte edível das amêijoas (total e fracções subcelulares) acumulou o Cd linearmente em ambas as exposições durante o período de exposição (Figura 3.3 - A_I e A_{II}). No entanto, a velocidade de acumulação de Cd foi significativamente inferior neste tecido (0,69 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,994$; $p<0,05$) e 5,4 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,993$; $p<0,05$) para a exposição de 4 e 40 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente). Contudo, tal como nos outros tecidos, a velocidade de acumulação de Cd na fracção FBPM foi significativamente superior às outras fracções, em ambas as exposições (FBPM: 0,48 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,974$; $p<0,05$), FI: 0,31 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,931$; $p<0,05$) e FEPm: 0,35 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,968$; $p<0,05$) na exposição a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ e FBPM: 2,8 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,961$; $p<0,05$), FI: 2,1 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,950$; $p<0,05$) e FEPm: 1,5 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,870$; $p<0,05$) na exposição a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$).

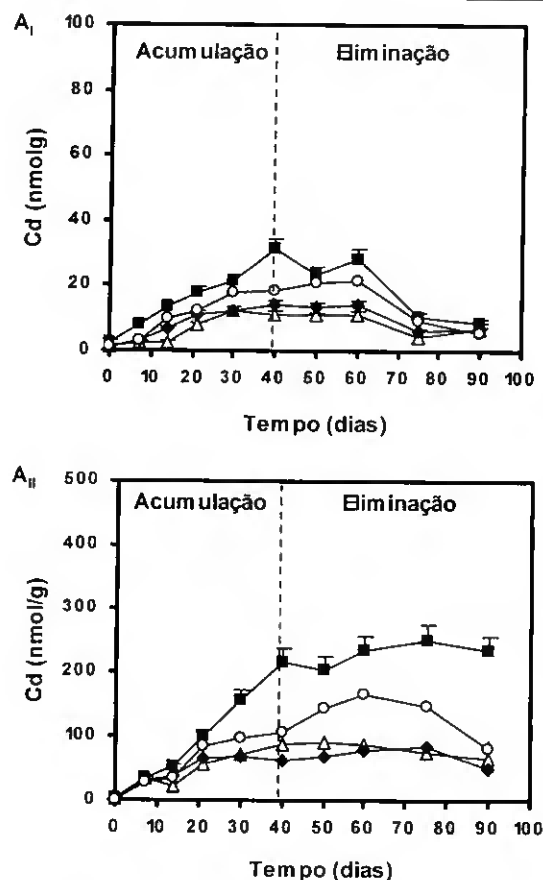


Figura 3.3 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e frações subcelulares) na restante parte edível das amêijoas expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ (I) e a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (II) durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração. (■ Total; Δ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM).

Duma forma geral, no final do período de exposição, os teores de Cd (total e frações subcelulares) nos três tecidos das amêijoas contaminadas com 4 e $40 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, foram significativamente superiores aos das amêijoas não contaminadas ($p < 0,05$). Tal como nas amêijoas não contaminadas, a glândula digestiva foi o tecido que apresentou teores de Cd mais elevados nas amêijoas expostas a ambas as concentrações de Cd, tendo aumentado em relação ao controlo cerca de 11 e 60 vezes nas amêijoas expostas a 4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3.1). Contudo nas brânquias, o incremento da concentração de Cd foi maior, observando-se um aumento de 30 e 123 vezes nas amêijoas expostas 4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3.1). Por último, a restante parte edível acumulou ao fim de 40 dias de exposição 12 e 84 vezes mais Cd que o

controle, para as duas exposições (Tabela 3.1). Quando comparadas as concentrações de Cd nos diferentes tecidos das amêijoas expostas a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ verificam-se diferenças significativas em todos os tecidos, ao fim dos 40 dias de exposição ($p < 0,05$).

A distribuição subcelular de Cd, ao fim de 40 dias de exposição, alterou-se relativamente à observada nos tecidos das amêijoas não contaminadas. Assim nas brânquias, em ambas as exposições (Tabela 3.1), a percentagem de Cd na fracção FBPM aumentou significativamente, enquanto que, nas fracções FEPM e FI a percentagem deste metal diminuiu ($p < 0,05$). Na glândula digestiva das amêijoas expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ observou-se o mesmo padrão distribuição que o observado nas amêijoas não contaminadas, enquanto que nas amêijoas expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ a percentagem aumentou significativamente na fracção particulada (FI) e diminuiu na fracção FEPM ($p < 0,05$), observando-se a seguinte distribuição: FBPM > FI > FEPM (Tabela 3.1). Na restante parte edível a distribuição de Cd foi diferente da observada no controle, tendo-se observado nas amêijoas expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ a seguinte distribuição subcelular: FBPM > FEPM > FI enquanto que nas amêijoas expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$: FBPM > FI > FEPM (Tabela 3.1).

Desta forma verifica-se que ao fim de 40 dias de exposição (4 e 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$), a fracção FBPM apresenta uma maior percentagem de Cd acumulado em todos os tecidos de *R. decussatus*. Por outro lado, também se verificou que na exposição mais alta, a fracção insolúvel (FI) começa a ter um papel importante (Tabela 3.1).

Aos dados de acumulação de Cd foi aplicado um modelo cinético de 1ª ordem, com o objectivo de saber se alguns destes tecidos acumula Cd até ser atingindo um estado estacionário na concentração deste metal. Este modelo prevê que seja atingido um estado estacionário na concentração de Cd ao fim de um determinado tempo de exposição, limitado pela taxa de difusão do metal para o interior da célula e/ou da saturação do sistema de ligandos. A aplicação deste modelo só foi significativa para as concentrações de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Figura 3.4), mostrando que só neste tecido e na exposição mais elevada existe uma tendência para atingir um estado estacionário na concentração deste elemento. O factor de bioconcentração e as taxas de assimilação (K_a) e de depuração (K_d) de Cd calculadas encontram-se na Tabela 3.3.

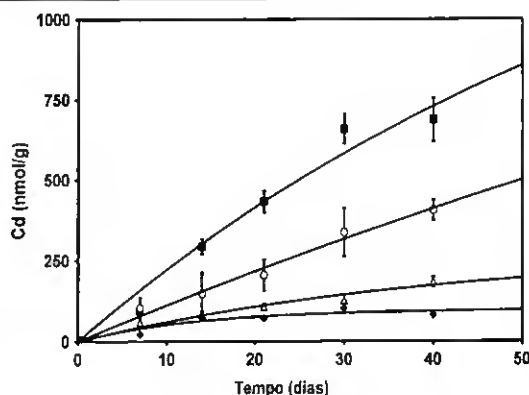


Figura 3.4 - Concentrações de Cd (média $\pm \sigma$) (total e frações subcelulares) experimentais e evolução prevista no modelo cinético de 1^o ordem, nas brânquias das amêijoas expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$, durante 40 dias.
(■ Total; Δ FI; \diamond FEPM; \circ FBPM)

Tabela 3.3 – Factor de bioconcentração (FBC), taxa constante de assimilação (K_a) e taxa constante de depuração (K_d) nas brânquias (total e frações subcelulares) das amêijoas expostas a $40 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, durante 40 dias.

	40 $\mu\text{g l}^{-1}$			
	FBC	K_a (dia^{-1})	K_d (dia^{-1})	r
Total	4786	67	0,014	0,978
FI	760	19	0,025	0,971
FEPM	270	20	0,074	0,920
FBPM	6400	32	0,005	0,954

FBC - Factor de bioconcentração corresponde a K_a / K_d .

O FBC é superior na fração FBPM comparativamente com o calculado nas outras frações subcelulares, indicando que esta fração nas brânquias desta amêijoia assimila mais rapidamente os teores de Cd ($K_a = 32 \text{ d}^{-1}$), e elimina mais lentamente este metal ($K_d = 0,005 \text{ d}^{-1}$) (Tabela 3.3), pelo que o estado estacionário é atingido após os 40 dias de exposição (Figura 3.4).

3.3.1.2. Eliminação de Cd

Durante o período de eliminação (40° - 90° dia), a concentração total de Cd nas brânquias das ameijoas pré-expostas a 4 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Figura 3.1-A_I), diminuiu linearmente com uma velocidade de eliminação de 1,5 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,882$; $p<0,05$), tendo no final do período de depuração eliminado 58% do total de Cd acumulado. O tempo de meia vida de Cd estimado neste tecido através do ajuste linear foi de 49 dias. O mesmo padrão de eliminação foi observado na fracção subcelular FBPM, no entanto com uma velocidade de eliminação significativamente inferior (0,65 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$; $r=0,796$; $p<0,05$), esta fracção apenas conseguiu eliminar 35% do Cd acumulado e foi estimado um tempo de meia vida deste elemento de 88 dias. Por outro lado, os teores de Cd nas fracções FI e FEPM não variam significativamente durante os 50 dias de depuração ($p>0,05$).

Nas brânquias das ameijoas pré-expostas a 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Figura 3.1-A_{II}) os teores de Cd (total e fracções subcelulares) também foram eliminados linearmente durante o período de depuração, à excepção da FEPM na qual a concentração de Cd só diminuiu nos últimos 10 dias de depuração. A velocidade de eliminação no total e nas diferentes fracções subcelulares das ameijoas pré-expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ foi significativamente superior à das pré-expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Total: 10,2 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,896$; $p<0,05$); FBPM: 7,4 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,847$; $p<0,05$) e FI: 2,4 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,869$; $p<0,05$)). Este tecido (total e fracções subcelulares) conseguiu eliminar mais de 75% do total de Cd acumulado, tendo sido estimada um tempo de meia vida deste metal de 40 dias no total e de 43 e 32 dias nas fracções FBPM e FI, respectivamente.

De uma forma geral, as brânquias das ameijoas pré-expostas à concentração mais elevada, conseguiram eliminar de forma mais eficaz os teores de Cd acumulados. De facto, na exposição a 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ mais de 75% dos teores de Cd (quer no total quer nas diferentes fracções subcelulares) foram eliminados, apesar dos 50 dias de depuração não terem sido suficientes para eliminar completamente os teores de Cd acumulados.

Durante o período de depuração, a concentração total de Cd na glândula digestiva das ameijoas pré-expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.2-A_I), continuou a aumentar durante os

primeiros 10 dias de depuração, atingindo uma concentração de $419,1 \pm 42,0 \text{ nmol g}^{-1}$. Após este período a concentração deste metal diminui linearmente, com uma velocidade de eliminação de $3,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,779$; $p<0,05$), tendo no final do período de depuração eliminado somente 27% do total de Cd acumulado. O tempo de meia vida de Cd estimado neste tecido através do ajuste linear foi de 78 dias. Contrariamente, a concentração de Cd nas fracções subcelulares apresentou um padrão oscilatório, não tendo nenhuma das fracções conseguido eliminar o Cd acumulado. Desta forma, não foi possível estimar o tempo de meia vida deste metal nas diferentes fracções subcelulares da glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$.

No mesmo tecido das amêijoas pré-expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.2-A_{II}) os teores totais de Cd acumulados (total e fracções subcelulares) foram eliminados linearmente ao longo do tempo de depuração (Total: $18,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,939$; $p<0,05$); FBPM: $12,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,971$; $p<0,05$); FI: $7,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,867$; $p<0,05$) e FEPM: $2,0 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,847$; $p<0,05$)). No final do período de depuração este tecido (total e fracções subcelulares) conseguiu eliminar - 50% do Cd acumulado, à excepção da fracção FI que eliminou uma parte mais considerável de Cd (70%). O tempo de meia vida de Cd estimado através do ajuste linear foi de 49 dias para o total do tecido e de 46, 44 e 57 dias nas fracções FBPM, FI e FEPM, respectivamente.

Tal como nas brânquias, a eliminação do Cd acumulado na glândula digestiva dependeu da exposição. As amêijoas expostas à concentração de Cd mais elevada ($40 \mu\text{g l}^{-1}$) parecem eliminar mais eficientemente os teores deste elemento, comparativamente com as expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$. No entanto, as brânquias, eliminam uma maior percentagem de Cd acumulado (75%) comparativamente com este tecido (27 a 70%).

A restante parte edível das amêijoas pré-expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.3-A_D), também eliminou os teores de Cd (total e nas fracções subcelulares) linearmente durante todo o período de depuração (Total: $0,48 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,913$; $p<0,05$), FBPM: $0,32 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,876$; $p<0,05$), FEPM: $0,18 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,876$; $p<0,05$), FI: $0,13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,798$; $p<0,05$)). Ao fim de 50 dias de depuração foram eliminados 79% do Cd total acumulado e 76, 56 e 44% nas fracções FBPM, FEPM e FI. O tempo de meia vida de

Cd estimado neste tecido foi de 30 dias e de 39, 41 e 44 dias em cada uma das respectivas fracções.

Nas amêijoas pré-expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$, o Cd total na restante parte edível não foi eliminado, durante o período de depuração (Figura 3.3-A_{II}). Contrariamente, parte dos teores de Cd acumulados foram eliminados nas fracções subcelulares. Assim, na fracção FBPM o Cd começou a ser eliminado a partir do 20º dia de depuração, tendo esta fracção eliminado 22% do Cd acumulado no fim do período de eliminação, enquanto que nas fracções FI e FEPM os teores de Cd só começaram a ser eliminados a partir do 35º dia de depuração, tendo sido apenas eliminados 27% e 17% do Cd acumulado.

Comparativamente com as brânquias e a glândula digestiva, a eliminação na restante parte edível apresenta um comportamento inverso. Os teores de Cd acumulados (no total e nas diferentes fracções subcelulares) são mais facilmente eliminados nas amêijoas expostas à concentração de Cd mais baixa ($4 \mu\text{g l}^{-1}$), enquanto que nas expostas à concentração de Cd mais elevada ($40 \mu\text{g l}^{-1}$) o tempo de depuração não foi suficiente para eliminar os teores deste elemento, apesar das fracções subcelulares conseguirem eliminar parte dos teores de Cd acumulados (17-27%).

No final do período de eliminação (dia 90) a distribuição subcelular de Cd nos três tecidos, não se alterou relativamente à observada no fim do período de acumulação (dia 40), à excepção da restante parte edível das amêijoas pré-expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$, em que $\text{FEPM} \approx \text{FI} > \text{FBPM}$ (Tabela 3.1).

Tal como para os dados de acumulação, também foi aplicado o modelo cinético de 1ª ordem aos dados de eliminação, mas este modelo só foi significativo nas brânquias e na glândula digestiva das amêijoas expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.5). Com base neste modelo foi calculada a taxa de eliminação (K'_e), e consequentemente o tempo de meia vida deste elemento ($t_{1/2}$) nos tecidos de *R. decussatus* (Tabela 3.4).

O tempo de meia vida de Cd estimado pelo modelo cinético nas brânquias e na glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (Tabela 3.3) foi próximo do calculado pelo modelo linear ($t_{1/2} = 40$ dias nas brânquias e $t_{1/2} = 49$ dias na glândula digestiva), mostrando mais uma vez que, o tempo de meia vida deste metal na

glândula digestiva (55 dias) é superior ao das brânquias (45 dias) (Tabela 3.3). Relativamente à permanência de Cd nas diferentes frações subcelulares, verificou-se que o Cd é mais dificilmente eliminado na fração FEPM, seguido da FBPM e por último da fração FI, em ambos os tecidos.

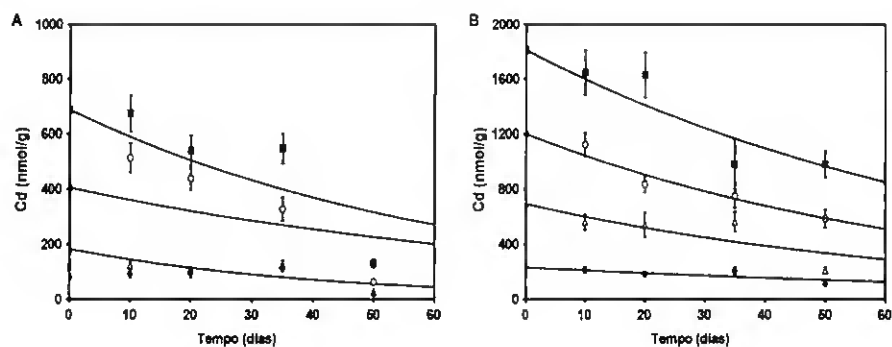


Figura 3.5 - Concentrações de Cd (média $\pm \sigma$) (total e nas frações subcelulares) experimentais e evolução prevista no modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias (A) e glândula digestiva (B) das amêijoas pré-expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ ao longo de 50 dias de depuração.
(■ Total; Δ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM).

Tabela 3.4 - Concentração inicial de Cd (C_i), taxa constante de eliminação (K_d) e tempo de meia-vida $t_{1/2}$ (no total e nas frações subcelulares) das brânquias e da glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cd e depuradas durante 50 dias.

	C_i (nmol g ⁻¹)	K_d (dia ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dia)	r
Brânquias				
Total	687,0 \pm 69,9	0,016	45	0,806
FI	183,3 \pm 16,7	0,023	30	0,833
FEPM	81,2 \pm 8,11	-	-	-
FBPM	405,4 \pm 31,3	0,012	60	0,654
Glândula Digestiva				
Total	1811 \pm 165	0,013	55	0,875
FI	695,0 \pm 70,0	0,015	48	0,793
FEPM	232,4 \pm 22,4	0,010	71	0,764
FBPM	1200 \pm 72,5	0,014	49	0,946

3.3.2. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

A concentração de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a 4 e 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias, encontra-se na Figura 3.6. Os dados de MT resultantes deste ensaio encontram-se em anexo (Tabela A.13).

Os teores médios ($\pm \sigma$) de MT nos três tecidos das amêijoas não contaminadas ($344 \pm 26 \text{ nmol g}^{-1}$ nas brânquias, $656 \pm 62 \text{ nmol g}^{-1}$ na glândula digestiva e $309 \pm 32 \text{ nmol g}^{-1}$ na restante parte edível) não variaram significativamente durante o ensaio experimental ($p > 0,05$). Tal como para os teores de Cd, a glândula digestiva corresponde ao tecido que apresenta teores desta proteína mais elevados, sendo significativamente superiores aos das brânquias e da restante parte edível ($p < 0,05$), entre os quais não existem diferenças significativas entre os teores de MT ($p > 0,05$).

3.3.2.1. Indução de MT

Os teores de MT nas brânquias das amêijoas expostas a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cd (Figura 3.6-A) aumentaram linearmente ($p < 0,05$) durante os primeiros 21 dias de exposição, com uma velocidade de indução de 5,0 $\text{nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,989$) e de 11,2 $\text{nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,880$), respectivamente. Após este período os teores de MT parecem ter atingido uma fase estacionária, para uma concentração de 420 ± 15 e de $595 \pm 10 \text{ nmol g}^{-1}$. No final do período de exposição, os teores de MT nas brânquias das amêijoas contaminadas foram significativamente superiores aos teores de MT nas brânquias das amêijoas não contaminadas ($p < 0,05$).

Na glândula digestiva observou-se um comportamento idêntico ao das brânquias (Figura 3.6-B). No entanto, nas amêijoas expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ esse aumento ocorreu apenas durante os primeiros 14 dias de exposição. A velocidade de indução de MT nas amêijoas expostas a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cd (16,8 $\text{nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r = 0,995$; $p < 0,05$) foi significativamente superior à das amêijoas expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ (10,5 $\text{nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r = 0,715$; $p < 0,05$). Tal como nas brânquias, a concentração de MT na glândula digestiva no final de período de exposição foi significativamente diferente dos da MT nas amêijoas não contaminadas ($p < 0,05$).

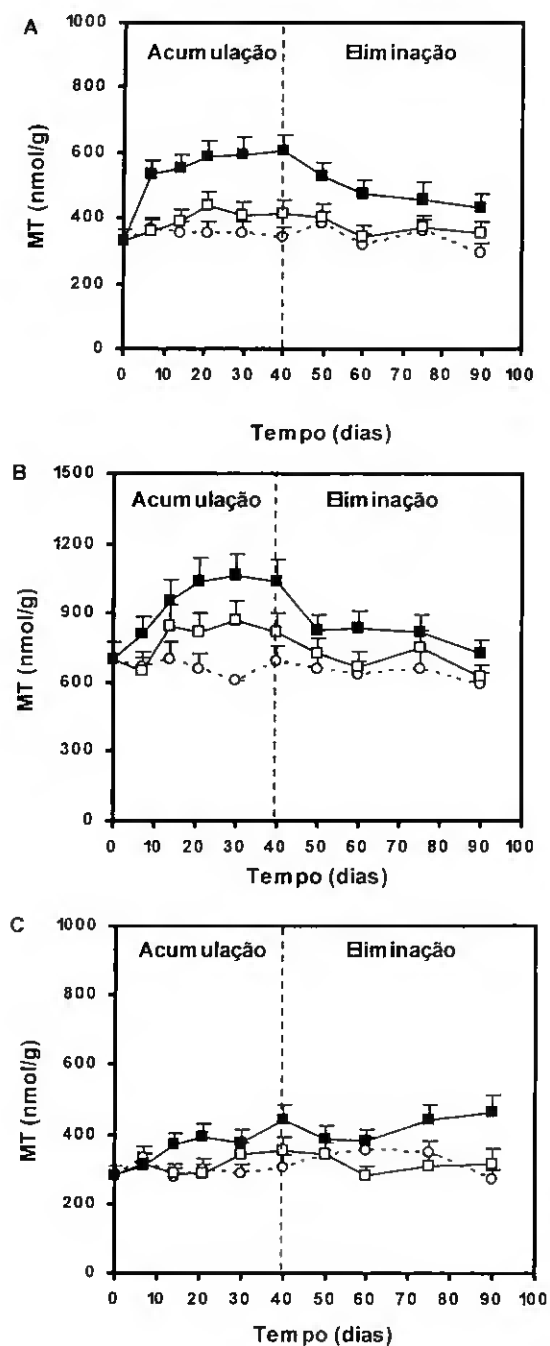


Figura 3.6 - Concentração (média \pm σ) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), das amêijoas não contaminadas e expostas a 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ durante 40 dias de exposição e 50 dias de depuração (○ controle; □ 4 $\mu\text{g l}^{-1}$; ■ 40 $\mu\text{g l}^{-1}$).

A indução da síntese de MT na restante parte edível das amêijoas expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.6-C) ocorreu a partir do 14º dia de exposição ($2,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r=0,939$; $p<0,05$), tendo esta proteína atingindo, no final do período de exposição, uma concentração ($352 \pm 40 \text{ nmol g}^{-1}$) 1,1 vezes superior ao controlo. Por outro lado, nas amêijoas expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 3.6-C) a indução da síntese de MT ocorreu durante todo o período de exposição ($3,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r=0,934$; $p<0,05$), sendo os teores desta proteína ao fim de 40 dias de exposição ($442 \pm 45 \text{ nmol g}^{-1}$) significativamente superiores (1,4 vezes) à concentração de MT nas amêijoas não contaminadas ($p<0,05$). A indução da síntese de MT na restante parte edível foi significativamente inferior à dos outros tecidos ($p<0,05$), com exceção das brânquias das amêijoas expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ ($p<0,05$).

3.3.2.2. Eliminação

Durante o período de eliminação, a concentração de MT nas brânquias das amêijoas pré-expostas a 4 e a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ diminuíram exponencialmente ($\text{MT} = 402 e^{-0,003t}$, $r=0,735$; $p<0,05$ e $\text{MT} = 572 e^{-0,006t}$, $r=0,936$; $p<0,05$ em cada uma das respectivas exposições) (Figura 3.6-A). O tempo de meia vida da MT estimado neste tecido foi de 20 e 30 dias nas amêijoas contaminadas com 4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente.

Similarmente, os teores de MT na glândula digestiva decresceram exponencialmente durante o período de eliminação, quer nas amêijoas pré-expostas a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\text{MT} = 808 e^{-0,007t}$, $r=0,809$; $p<0,05$) quer a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\text{MT} = 959 e^{-0,006t}$, $r=0,866$; $p<0,05$) (Figura 3.6-B). O tempo de meia vida da MT na glândula digestiva foi comparativamente inferior ao das brânquias, sendo de 14 e 22 dias nas amêijoas contaminadas com 4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente.

Os teores de MT na restante parte edível das amêijoas, durante o período de eliminação e em ambas as pré-exposições ao Cd, decresceram linearmente durante os primeiros 20 dias de depuração, com uma velocidade de degradação de $3,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,926$; $p<0,05$) na pré-exposição a $4 \mu\text{g l}^{-1}$ e de $3,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,920$; $p<0,05$) na pré-exposição a $40 \mu\text{g l}^{-1}$. Após este período, a concentração desta proteína não variou significativamente até ao final do ensaio ($p<0,05$) (Figura 3.6-C). O tempo de meia vida calculado neste tecido através do ajuste linear foi de 9 e 18 dias nas amêijoas contaminadas com 4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente.

3.3.3. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E Cd NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

Na Figura 3.7 estão representadas as relações entre as concentrações de MT e de Cd (total e na fracção FBPM) em cada um dos tecidos analisados, durante os períodos de acumulação e de depuração.

Os teores de MT aumentaram com o aumento da concentração de Cd nos tecidos (total e fracção FBPM) durante o período de acumulação, e diminuíram com o decréscimo dos teores deste metal durante o período de depuração, sendo as relações lineares encontradas significativas para todos os tecidos e em ambos os períodos ($p < 0,05$). A taxa de aumento dos teores de MT em função da concentração de Cd foi superior na fracção FBPM comparativamente com o total, em todos os tecidos e nos dois períodos (Figura 3.7).

Os coeficientes angulares das relações lineares para todos os tecidos (total e FBPM) foram significativamente superiores durante o período de acumulação relativamente aos encontrados durante o período de depuração, mostrando que a taxa de indução de MT com o aumento dos níveis de Cd é superior à taxa de degradação desta proteína durante o período de eliminação (Figura 3.7).

Há medida, que o Cd foi acumulado e a MT induzida, os átomos de Cd vão-se ligando às novas moléculas de MT sintetizadas. Isto pode ser observado através da razão molar entre os níveis da MT e o Cd acumulado na fracção FBPM. Na Tabela 3.5 compara-se a relação molar MT:Cd ao longo do período de exposição e de depuração nos diferentes tecidos de *R. decussatus* expostos a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cd.

No início do período de exposição (dia 0), em todos os tecidos existe uma grande quantidade de MT que não está directamente ligada ao Cd (Tabela 3.5). Durante o decorrer da exposição (0 – 40º dia) verificou-se que a razão entre a MT:Cd diminuiu, indicando que o Cd se ligou preferencialmente à MT induzida. Esta observação foi mais evidente na exposição mais elevada (40 $\mu\text{g l}^{-1}$) nas brânquias e na glândula digestiva. No entanto, ao fim de 40 dias de exposição o Cd não saturou a MT em nenhum dos tecidos, considerando a capacidade de saturação desta proteína, a qual nos mamíferos liga-se a sete átomos de Cd (1:7) e nos crustáceos a seis (1:6) (Otvos *et al.*, 1982).

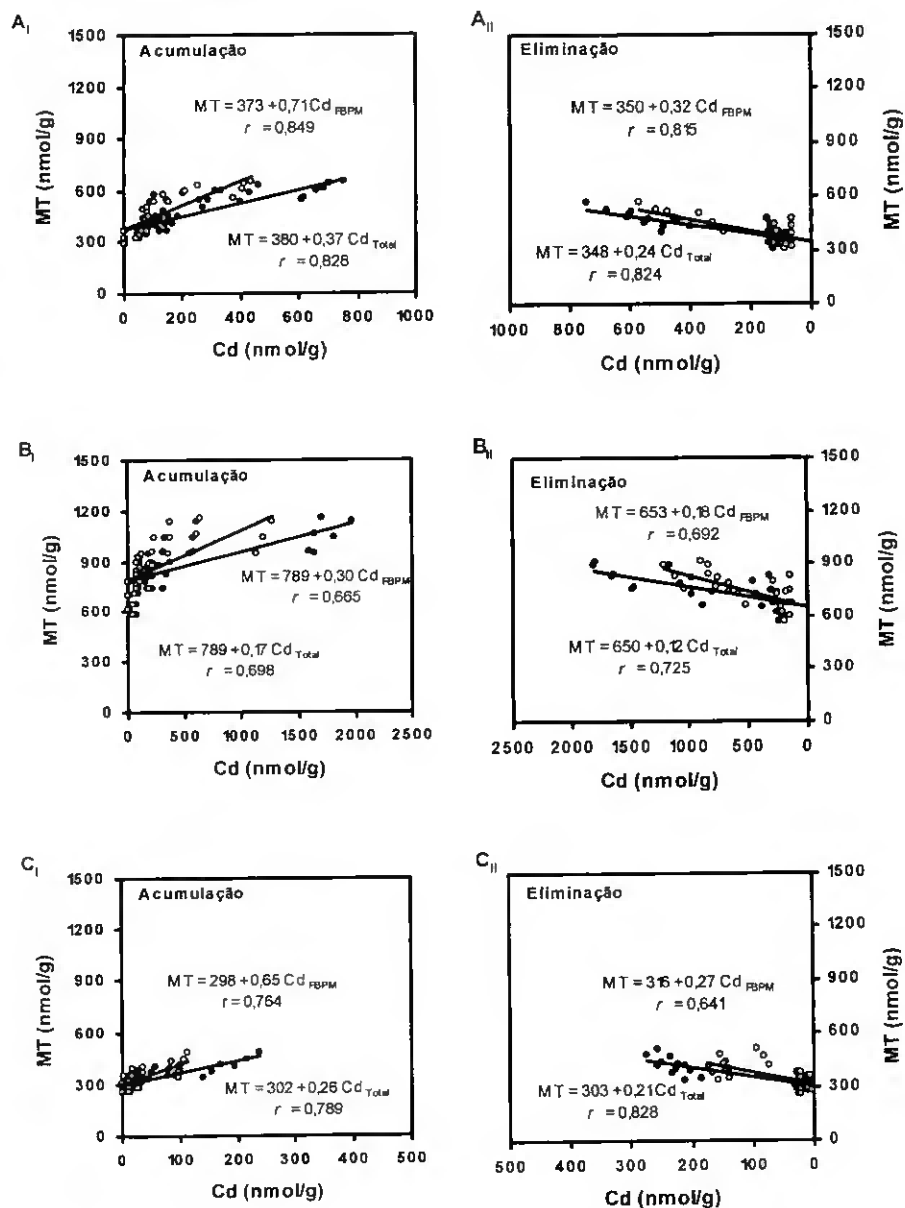


Figura 3.7 - Relação entre as concentrações de MT e Cd nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), durante os períodos de acumulação (I) e de eliminação (II). Total (●) e fração FBPM (○).

Durante o período de eliminação (50 – 90º dia) a razão MT:Cd de uma forma geral, não apresentou grandes alterações relativamente ao 40º dia de exposição, indicando que o Cd ligado à MT é dificilmente eliminado.

Tabela 3.5 – Razão molar MT:Cd na fracção FBPM em diferentes tecidos das amêijoas expostas durante 40 dias a 4 e a 40 µg l⁻¹ de Cd e depuradas durante 50 dias.

Dias	Brânquias		Glândula digestiva		Resto	
	4 µg/l	40 µg/l	4 µg/l	40 µg/l	4 µg/l	40 µg/l
0	1:0,004	1:0,004	1:0,01	1:0,01	1:0,003	1:0,003
7	1:0,1	1:0,2	1:0,1	1:0,2	1:0,01	1:0,1
14	1:0,2	1:0,3	1:0,1	1:0,2	1:0,03	1:0,1
21	1:0,2	1:0,3	1:0,1	1:0,4	1:0,04	1:0,2
30	1:0,2	1:1	1:0,1	1:1	1:0,1	1:0,3
40	1:0,2	1:1	1:0,2	1:1	1:0,05	1:0,2
50	1:0,3	1:1	1:0,3	1:1	1:0,1	1:0,4
60	1:0,3	1:1	1:0,2	1:1	1:0,1	1:0,4
75	1:0,3	1:1	1:0,2	1:1	1:0,03	1:0,3
90	1:0,2	1:0,1	1:0,3	1:1	1:0,02	1:0,2

3.4. DISCUSSÃO

Quando se pretende compreender o papel da MT no sequestro de Cd durante os processos de acumulação e depuração, em diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus*, é necessário conhecer a cinética de acumulação e depuração e a distribuição subcelular deste elemento, para se poder concluir sobre a afinidade deste metal para os diferentes ligandos.

O aumento da quantidade de Cd nos diferentes tecidos de *R. decussatus*, mesmo em exposições mais baixas deste elemento, é comparável com os resultados obtidos noutros trabalhos com esta espécie (Vicente *et al.*, 1988; Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Gnassia-Barelli *et al.*, 1995; Bebianno & Serafim, 1998) quer com outras espécies de amêijoas *M. balthica* (Langston & Zhou, 1987; Bordin *et al.*, 1997), *R. philippinarum* (Blasco & Puppo, 1999) e de moluscos, incluindo a ostra, *Ostrea edulis* e *C. gigas* (Frazier & George, 1983), o mexilhão, *M. edulis* (Scholz, 1980; Everaats, 1990; Bebianno & Langston, 1991) e *M. galloprovincialis* (Viarengo *et al.*, 1985; Serafim *et al.*, 2002) e gastrópodes *Littorina littorea* (Bebianno *et al.*, 1992), em que se verifica que o Cd é acumulado nos diferentes tecidos e essa acumulação depende do tempo de exposição, mostrando que a taxa de excreção deste elemento é muito baixa comparativamente com a de acumulação. Apesar de todos os tecidos de *R. decussatus* terem acumulado Cd, a acumulação deste elemento apresenta um comportamento distinto em cada um dos tecidos e é dependente da concentração a que as amêijoas estiveram expostas.

Na exposição à concentração mais baixa ($4 \mu\text{g l}^{-1}$), as brânquias e a restante parte edível acumularam os teores de Cd linearmente com o tempo, mostrando que estes tecidos apresentam uma capacidade de acumular este metal sem nunca saturar os ligandos disponíveis (Figuras 3.1 e 3.3). Enquanto que, os teores de Cd na glândula digestiva aumentaram exponencialmente durante todo o período de exposição, reflectindo um aumento na velocidade de acumulação ao longo do tempo, traduzido pelo transporte de metais entre tecidos e uma disponibilidade de ligandos capaz de se ligar ao Cd (Figura 3.2).

Por outro lado na exposição à concentração mais elevada ($40 \mu\text{g l}^{-1}$), a glândula digestiva e restante parte edível apresentaram o mesmo comportamento, com velocidades de acumulação respectivamente superiores comparativamente com a exposição a $4 \mu\text{g l}^{-1}$, mostrando o efeito da exposição (Figuras 3.1 e 3.3). Contrariamente, a acumulação de Cd nas brânquias expostas à concentração mais elevada, seguiu o modelo cinético de 1ª ordem, o qual reflecte inicialmente uma assimilação rápida de Cd em relação à sua eliminação e à medida que o tempo decorre, a taxa de assimilação de Cd decresce (limitada pela taxa de difusão deste metal para o interior da célula e/ou da saturação do sistema de ligandos), com a tendência para este elemento atingir um estado estacionário (Figura 3.4). Resultados semelhantes foram obtidos nas brânquias da mesma espécie de amêijoia exposta a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Bebianno & Serafim, 1998) e a $400 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Bebianno *et al.*, 1993), em que os teores deste metal foram acumulados linearmente até ao 30º dia de exposição, atingindo posteriormente um patamar na concentração de Cd até ao 40º dia.

Os diferentes padrões de acumulação observados nos tecidos estão relacionados com a superfície de adsorção de cada tecido em contacto com o Cd dissolvido (Cunningham, 1979) e/ou com os ligandos disponíveis no meio intracelular. As brânquias e o manto (incluído na restante parte edível) estão em contacto directo com o meio exterior e os seus teores de Cd são supostamente representativos do grau de contaminação do meio e da duração de exposição (Dusquesne *et al.*, 1995), enquanto que, a glândula digestiva é um local de metabolização (presença de numerosas metaloenzimas) e de acumulação de metais a longo prazo.

Este comportamento é o resultado do balanço entre os mecanismos de incorporação e de eliminação do metal. A incorporação do Cd dissolvido é feita através de processos de difusão passiva, no qual o metal é adsorvido na superfície das células, provavelmente no muco, passando posteriormente através da membrana e unido-se a ligandos intra-celulares com grande afinidade, tais como a metalotionina (Viarengo, 1989). De facto, foi na fracção citosólica de baixo peso molecular (FBPM), na qual se encontram as MTs, que os teores de Cd foram mais elevados em todos os tecidos.

Na fracção solúvel o Cd pode estar ligado às MTs (FBPM) ou pode reagir com outros componentes celulares tais como algumas enzimas (FEPM) e neste caso perturbando

o funcionamento normal do metabolismo, e consequentemente provocando efeitos tóxicos. Esta transferência de Cd na célula da fracção subcelular FBPM para FEPM é conhecida pelo fenómeno "spillover" (Viarengo, 1989; Couillard *et al.*, 1993). No presente estudo, apesar dos teores de Cd associados à FEPM terem aumentando ao longo do tempo de exposição nos diferentes tecidos, este aumento foi pouco significativo relativamente ao incremento dos níveis deste metal na FBPM, mostrando que esta fracção subcelular apresenta uma grande capacidade para ligar o excesso de iões Cd livres, de forma a evitar que esses se possam ligar às enzimas da fracção FEPM. Esta observação é mais visível nas brânquias onde os teores de Cd na FBPM passam de 44% nas amêijoas não contaminadas para 66 e 62% nas contaminadas com 4 e 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente, enquanto que na FEPM a percentagem de Cd ligado a esta fracção diminui (de 29% no controlo para 16 e 12% em cada uma das respectivas exposições) (Tabela 3.1 e Figura 3.1).

Contudo, a distribuição subcelular de Cd nos diferentes tecidos de *R. decussatus* mostra que existe uma quantidade considerável deste metal associado à fracção particulada (FI) (15 a 35%), o que pode ser explicado pela ligação deste metal a proteínas que podem ser posteriormente incorporadas em grânulos e concreções minerais através de processos de desintoxicação que ocorrem nos moluscos (Viarengo & Nott, 1993; George & Olsson, 1994; Roesijadi, 1994a; Mason & Jenkins, 1995). Esta fracção tem uma importância diferente em cada um dos tecidos, observando-se que na glândula digestiva das amêijoas, contrariamente aos outros tecidos, os teores de Cd nesta fracção aumentam (de 15% para 33% ao fim de 40 dias de exposição a 40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$) (Tabela 3.1 e Figura 3.2).

O Cd acumulado na fracção citosólica tratada termicamente provavelmente encontra-se ligado à MT, uma vez que o aumento dos teores de Cd nesta fracção foi acompanhado por um incremento nos níveis desta proteína, como pode ser comprovado pelas correlações positivas e significativas obtidas nos diferentes tecidos durante o período de acumulação (Figura 3.7).

O aumento dos níveis de MT nos tecidos de *R. decussatus* exposta a diferentes concentrações de Cd, vêm confirmar outros dados obtidos com esta espécie (Bebiano *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995;

Géret *et al.*, 2002) e com outras espécies de moluscos bivalves, nomeadamente em *M. galloprovincialis* (Pavicic *et al.*, 1987; Bebianno & Langston, 1992), *M. edulis* (Bebianno & Langston, 1991), *C. virginica* (Roesijadi & Klerks, 1989), *C. fluminea* (Baudrimont *et al.*, 2003), *P. grandis* (Perceval *et al.*, 2002), *D. polymorpha* (Lecoeur *et al.*, 2004). Estes resultados, tal como apontado por Park *et al.* (2001), mostram claramente a função protectora da MT contra os efeitos do Cd, pois mesmo em exposições a concentrações subletais deste elemento, observa-se uma indução de MT.

O nível de indução de MT também foi dependente dos tecidos e da concentração de Cd no meio. Os teores induzidos desta proteína foram superiores na exposição a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ comparativamente com a de $4 \mu\text{g l}^{-1}$, em todos os tecidos. No entanto, apesar dos teores de MT terem sido superiores na glândula digestiva, tal como a concentração de Cd, o incremento dos níveis de MT foi superior nas brânquias comparativamente com os outros tecidos. De facto, o coeficiente angular da relação linear desta proteína com a concentração de Cd é superior nas brânquias, comparativamente com os outros tecidos (Figuras 3.7A₁). Estas observações estão de acordo com os dados obtidos anteriormente nesta espécie (Tabela 3.6), em que se verifica que o incremento de MT é superior nas brânquias comparativamente com os outros tecidos.

Tabela 3.6 – Incremento na indução de MT em diferentes tecidos de *R. decussatus* expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição.

Tecido	Concentração de exposição ($\mu\text{g Cd l}^{-1}$)	Tempo de exposição (dias)	Incremento na Indução de MT	Referência
Brânquias	400	30	1,9	Bebianno <i>et al.</i> , 1993
Gl. Digestiva	"	"	1,3	"
Resto	"	"	1,3	"
Brânquias	250	7	não aumentou	Roméo & Gnassia-Barelli, 1995
Gl. Digestiva	"	"	"	"
Brânquias	100	40	4,5	Bebianno <i>et al.</i> , 1994
Gl. Digestiva	"	"	2,6	"
Resto	"	"	2,9	"
Brânquias	100	7	1,7	Bebianno & Serafim, 1998
Brânquias	40	40	1,8	Presente trabalho
Gl. Digestiva	"	"	1,6	"
Resto	"	"	1,4	"
Brânquias	4	40	1,2	Presente trabalho
Gl. Digestiva	"	"	1,2	"
Resto	"	"	1,1	"

O incremento desta proteína também depende da concentração e do tempo de exposição ao Cd, sendo de uma forma geral superior nas exposições a concentrações mais elevadas, à excepção da exposição a $400 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, o que poderá reflectir uma saturação da MT nesta espécie a esta concentração (Tabela 3.6).

A razão MT:Cd mostrou que o Cd foi sequestrado pelos níveis de metalotionina existentes e/ou induzidos nos diferentes tecidos, uma vez que esta razão diminui à medida que o tempo de exposição aumenta (Tabela 3.5). No entanto, verifica-se que o Cd não saturou a capacidade de ligação desta proteína, se considerarmos que esta proteína se pode ligar a 7 iões divalentes nos vertebrados e 6 no caranguejo *Squilla serrata* (Otvos *et al.*, 1982; Engel & Brouwer, 1989). No presente trabalho, a maior razão que traduziu o maior número de átomos ligados à MT (1:1), foi atingida ao fim de 30 dias de exposição nas brânquias e na glândula digestiva na exposição mais elevada ($40 \mu\text{g Cd l}^{-1}$) e prolongou-se pelo o período de depuração. Similarmente nas brânquias desta espécie exposta a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ foi encontrada uma razão de 1:3 ao fim de 30 dias de exposição (Bebianno & Serafim, 1998), ainda assim afastada dos níveis de saturação. Por outro lado, na mesma espécie exposta a $400 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ a MT atinge níveis próximos de saturação em todos os tecidos ao fim de 30 dias de exposição (1:7 nas brânquias; 1:5 na glândula digestiva; 1:3 na restante parte edível) (Bebianno *et al.*, 1993). Desta forma, o nível de saturação depende dos tecidos da ameijoia e da concentração de Cd no meio. Resultados semelhantes foram obtidos no total dos tecidos de *L. littorea*, em que o Cd satura a MT na exposição a $400 \mu\text{g l}^{-1}$ ao fim de 65 dias de exposição, mas não nas doses inferiores (Bebianno *et al.*, 1992).

Durante o período de depuração, a eliminação de Cd foi dependente da concentração a que organismos foram pré-expostos. O Cd foi eliminado mais lentamente na pré-exposição mais baixa, comparativamente aos mesmos tecidos das ameijoas pré-expostas a $40 \mu\text{g l}^{-1}$, excepto na restante parte edível onde os teores deste elemento não decresceram após esta exposição. Estes resultados provavelmente estão relacionados com a concentração de Cd existente nos diferentes tecidos no início do período de depuração, tal como apontado por Geffard *et al.* (2002b). Estes autores, a partir de uma concentração inicial de $1,9 \mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e $4,9 \mu\text{g g}^{-1}$ na glândula digestiva da ostra *C. gigas*, determinaram um tempo de meia vida de Cd muito

superior (125 dias nas brânquias e 87 dias na glândula digestiva) comparativamente com os obtidos por Okazaki & Panietz (1981) (60 dias nas brânquias e 32 dias na glândula digestiva) em que a concentração inicial foi de $9 \mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e de $12,4 \mu\text{g g}^{-1}$ na glândula digestiva.

Apesar da diminuição da concentração de Cd nos tecidos de *R. decussatus*, nenhum tecido conseguiu eliminar totalmente os teores deste metal acumulados. A capacidade limitada de eliminar o Cd, também foi observada noutras espécies de moluscos bivalves, como no mexilhão *M. edulis* ($t_{1/2} \approx 4$ meses; Viarengo, 1989; Maroni, 1990 e $t_{1/2} = 300$ dias; Bebianno & Langston, 1993), nas ostras *C. virginica* ($t_{1/2} = 70$ dias; Roesijadi, 1994a) e *C. gigas* ($t_{1/2} = 137$ dias; Geffard *et al.*, 2002b), e nos bivalves de água doce *C. fluminea* ($t_{1/2} = 500$ dias; Baudrimont *et al.*, 2003) e *D. polymorpha* (nenhum Cd foi eliminado durante um período de depuração de 14 dias; Mersch *et al.*, 1993).

Em paralelo com a eliminação de Cd, foi observada uma degradação de MT nos tecidos das amêijoas, a qual pode ser confirmada pela relação positiva e significativa existente entre os teores desta proteína e a concentração de Cd na FBPM em todos os tecidos de *R. decussatus*, durante o período de depuração (Figura 3.7). No entanto, a relação existente entre a taxa de degradação da MT relativamente à diminuição da concentração de Cd durante o período de depuração, foi inferior à taxa de indução desta proteína em função do aumento da concentração de Cd durante o período de acumulação. Deste modo, a indução de MT para ligar os iões de Cd livres corresponde a um processo mais rápido comparativamente com libertação deste metal da MT, devido provavelmente à estabilidade do complexo MT-Cd (Viarengo, 1989). Estas observações podem ser comprovadas através da razão MT:Cd a qual se mantém praticamente inalterada durante o período de depuração (Tabela 3.5).

Apesar da estabilidade deste complexo, o tempo de meia vida desta proteína foi menor comparativamente com o tempo de meia vida do Cd em cada um dos tecidos e nas diferentes exposições. Resultados semelhantes foram obtidos na *C. virginica* em que o tempo de meia de MT foi de 20 dias comparado com um tempo de meia vida de Cd de 70 dias (Roesijadi, 1994a). Similarmente no *M. edulis* o tempo de meia vida de MT e Cd foram respectivamente de 25 e 300 dias (Bebianno & Langston, 1993).

Cosson (2000) também refere que o tempo de meia vida das MT's é geralmente menor comparativamente com o tempo de meia vida dos metais, especialmente para o Cd. Estes resultados parecem mostrar que, a manutenção do Cd nos tecidos pode estar relacionada com uma reciclagem do complexo MT-Cd, em que o Cd libertado conduz à indução da síntese de MT, tal como sugerido por Langston *et al.* (1998).

No entanto, a eliminação de Cd e a degradação de MT diferem entre os tecidos da amêijoia *R. decussatus*. O tempo de meia vida de Cd, em ambas as exposições, foi inferior nas brânquias comparativamente com a glândula digestiva ($t_{1/2}$ de 49 e 45 dias nas brânquias e de 78 e 55 dias na glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente), enquanto que o tempo de meia vida calculado para a MT é superior nas brânquias relativamente à glândula digestiva ($t_{1/2}$ de 20 e 30 dias nas brânquias e de 14 e 22 dias na glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente). Isto pode ser explicado, pelos níveis desta proteína na glândula digestiva serem significativamente mais elevados que nas brânquias e que a permanência deste metal possa estar relacionada com uma reciclagem do complexo MT-Cd. Na restante parte edível o tempo de meia vida de MT é inferior ($t_{1/2}$ de 8 e 18 dias nas amêijoas pré-expostas a 4 e a 40 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente). Langston *et al.* (1998), também referem o envolvimento da MT mais evidente nas brânquias e na glândula digestiva dos organismos, reflectindo o significado destes tecidos na incorporação, acumulação e eliminação de metais.

Estes resultados foram contraditórios aos apresentados por Geffard *et al.*, (2002b) e Okazaki & Panietz (1981), em que referem um tempo de meia vida de Cd nas brânquias superior ao da glândula digestiva na ostra *C. gigas*. Por outro lado, e também contrariamente aos resultados obtidos nesta na amêijoia, Geffard *et al.* (2002b) mostraram que os metais na fracção solúvel são mais facilmente eliminados que na fracção insolúvel, nos tecidos de *C. gigas*. No presente trabalho, verificou-se que o tempo de meia vida de Cd é superior na fracção FEPM, seguido da FBPM e por último da fracção FI, nas brânquias e glândula digestiva das amêijoas (Tabela 3.4), mostrando que a concentração de Cd na fracção insolúvel é mais facilmente eliminada que na fracção solúvel, talvez devido à ligação deste metal à MT. Estes resultados provavelmente reflectem diferenças inter-específicas entre estas duas espécies no metabolismo de Cd, o que poderá estar associado a diferentes processos de

desintoxicação deste metal. De facto, a desintoxicação de metais através de ligação destes a depósitos minerais, corresponde a um processo importante nas brânquias das ostras (George *et al.*, 1978; Thomson *et al.*, 1985).

De uma forma geral, os resultados sugerem que os processos de degradação e regeneração de MT observados na amêijoia *R. decussatus* exposta a Cd, mantêm teores elevados desta proteína, evitando que o ião Cd livre interfira no metabolismo dos tecidos desta espécie e assim funcionando como mecanismo de desintoxicação deste metal, tal como já fora sugerido por Bebianno *et al.* (1993).

Capítulo IV

TOXICIDADE, ACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE COBRE NOS TECIDOS DA AMÊIJOA *Ruditapes decussatus*: COMPORTAMENTO DA METALOTIONINA

4.1. INTRODUÇÃO

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.3. RESULTADOS

4.4. DISCUSSÃO

4.1. INTRODUÇÃO

Entre os metais que podem ser encontrados em ecossistemas contaminados, o cobre (Cu) apresenta um interesse especial, pois apesar de ser um elemento essencial à vida dos organismos aquáticos a sua toxicidade está bem estabelecida. O Cu é um metal de transição, com função de co-factor em numerosas enzimas, tais como o citocromo oxidase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase, dopamina hidroxilase, tirosinase e lisil oxidase (Ryu *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2002). Para o crescimento dos organismos é necessária uma concentração mínima de Cu. Em particular, os moluscos têm maiores necessidades deste elemento para os componentes do pigmento respiratório hemocianina (Rainbow, 1990). No entanto, a presença de Cu em concentrações superiores às requeridas pelos organismos torna-se tóxica para as células. Esta toxicidade resulta do radical hidroxilo que é produzido durante o ciclo redox, entre Cu^+ e Cu^{2+} , e a sua ligação indiscriminada a outras proteínas, provocando danos celulares como a peroxidação lipídica, inactivação enzimática e alteração da estrutura de ADN (Halliwell & Gutteridge, 1985). Cheung & Wong (1998) observaram que os moluscos expostos ao Cu a concentrações elevadas apresentam um decréscimo no consumo de oxigénio e na taxa de excreção de amónia. Vários estudos mostraram que a concentração de iões Cu livres de 10^{-12} a 10^{-9} M pode causar inibição de crescimento e *stress* metabólico em diferentes organismos aquáticos (Chang & Reinfelder, 2000).

Este elemento intervém principalmente em reacções que ocorrem no fluido extracelular, uma vez que a maior parte das proteínas contendo Cu encontram-se fora da célula, ou em vesículas, as quais apresentam um conteúdo similar ao encontrado no fluido extracelular (da Silva & Williams, 2001). No metabolismo celular normal, as concentrações de Cu livre são muito baixas ($<10^{-18}$ M) e são necessários transportadores citoplasmáticos específicos para transportar este metal para os diversos compartimentos celulares e para as enzimas que contêm Cu (O'Halloran & Culotta, 2000). No citoplasma encontra-se apenas uma enzima contendo Cu, que é responsável pela dismutação do anião superóxido (superóxido dismutase) e várias proteínas não enzimáticas com Cu, relacionadas com o transporte, tamponização e funções de transcrição (da Silva & Williams, 2001).

A tolerância de alguns bivalves a elevados níveis de Cu nos seus tecidos, reflecte a presença de processos de desintoxicação, os quais podem inibir os efeitos tóxicos deste metal. De facto, a capacidade de ligação do Cu no meio intracelular torna-se mais eficiente, quando sistemas de desintoxicação e armazenamento de Cu são induzidos, tais como a metalotionina (MT) (De Boeck *et al.*, 2003).

A ligação de Cu à MT prende-se com a função constitutiva destas proteínas, participando no controlo da disponibilidade intracelular de metais essenciais, para satisfazer os requisitos de componentes dependentes deste metal (Langston *et al.*, 1998). Por outro lado, a função desta proteína também pode estar associada a processos de desintoxicação, em que perante um excesso de Cu, este pode ligar-se à MT limitando a sua disponibilidade para se ligar a componentes inadequados (Liu *et al.*, 1991).

A dualidade funcional da MT (constitutiva e desintoxicante) permitiu considerar a hipótese de diferentes isoformas desta proteína poderem estar envolvidas na ligação a distintos metais, desempenhando estas isoformas papéis individuais no seu metabolismo (Roesijadi, 1994b). Em algumas espécies já foram identificadas isoformas com uma função constitutiva e outras com a função de desintoxicação, nomeadamente em embriões da ostra *C. virginica* (Ringwood & Brouwer, 1993), em organismos adultos desta espécie (Roesijadi, 1994b) e nos mexilhões *M. edulis* (Mackay *et al.*, 1993) e *M. galloprovincialis* (Ivankovic *et al.*, 2002) e no gastrópode *L. brevicula* (Ryu *et al.*, 2003). Na amêijoia *R. decussatus*, tal como referido no Capítulo I (secção 1.2.1.1) foram também identificadas várias isoformas desta proteína associadas ao Cd (Bebianno *et al.*, 2000; Simes *et al.*, 2003), mas não foi possível relacioná-las com as diferentes funções da MT.

Na maioria dos moluscos a assimilação de metais é mais rápida que a eliminação, pelo que a acumulação de metais pelos diferentes tecidos destes organismos é proporcional à concentração externa dos mesmos. Esta capacidade limitada de regular os níveis de metais no interior da célula constitui um dos principais critérios para incluir os moluscos em programas de monitorização, os quais requerem uma resposta entre a concentração de metais nos tecidos dos organismos e os níveis de contaminação ambiental. No entanto, esta resposta pode depender dos metais, ou seja,

se são essenciais ou não-essenciais para o metabolismo dos organismos (Langston *et al.*, 1998).

Alguns moluscos apresentam a capacidade de regular a concentração dos metais essenciais, tal como o Cu e Zn, enquanto que nos metais não essenciais (ex. Cd) esta capacidade é menos evidente (Capítulo III), verificando-se que os níveis de metais não-essenciais nos seus tecidos estão mais relacionados com os níveis ambientais. Estudos de campo realizados com *R. philippinarum* (Blasco & Puppo, 1999), *Septifer bilocularis* (Cooper *et al.*, 1982) e *P. grandis* (Giguère *et al.*, 2003) mostraram que estas espécies apresentam uma boa capacidade de regular os níveis de Cu, não tendo sido observadas diferenças apreciáveis nos níveis deste elemento entre os organismos recolhidos em áreas não contaminadas e contaminadas.

A amêijoia *R. decussatus* tem sido proposta como um excelente indicador dos níveis de Cd ambientais e os níveis de MT como biomarcador da contaminação de Cd (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000; Serafim & Bebianno, 2001, Bebianno & Serafim, 2003) (Capítulo III). No entanto, no caso do Cu ainda permanecem algumas dúvidas quanto à utilização desta espécie como indicadora de níveis de Cu ambientais e da MT como biomarcador de Cu.

Estudos efectuados com *R. decussatus* exposta a diferentes concentrações de Cu, nomeadamente 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Sobral & Widdows, 1997), 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Gnassia-Barelli *et al.*, 1995), 75 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998) e 150 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Gnassia-Barelli *et al.*, 1995; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995), mostraram que esta espécie acumula eficazmente os teores deste metal nos seus tecidos. No entanto, estudos de campo mostraram que esta amêijoia apresenta capacidade de regular os níveis deste metal, dependendo da concentração do meio (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000; Serafim & Bebianno, 2001, Bebianno & Serafim, 2003). Por outro lado, Gêret *et al.* (2002) verificaram que as brânquias desta espécie induzem a síntese de MT ao fim de 21 dias de exposição a 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$, mas não a concentrações inferiores (0,5 e de 2,5 $\mu\text{g l}^{-1}$). Roméo & Gnassia-Barelli (1995) também observaram a indução desta proteína nas brânquias de *R. decussatus* exposta a 150 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 7 dias, mas o mesmo comportamento não foi observado na glândula digestiva. Similarmente, Hamza-Chaffai *et al.* (1998) não

detectaram indução de MT na glândula digestiva desta amêijoia exposta a $75 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 5 dias.

Apesar dos estudos anteriores terem mostrado o envolvimento da MT em alguns tecidos desta espécie quando exposta a Cu, a ligação deste metal à MT nunca foi demonstrada, desconhecendo-se a distribuição de Cu nos diferentes componentes da fracção proteica de baixo peso molecular, na qual se encontra a MT. Por outro lado, quando se pretende conhecer o comportamento desta proteína em processos de acumulação e de eliminação de Cu, na amêijoia *R. decussatus* exposta a concentrações subletais e/ou agudas torna-se necessário conhecer a concentração letal de Cu, a qual nunca foi determinada para esta espécie.

Desta forma, o presente capítulo tem como objectivo determinar a toxicidade de Cu na amêijoia *R. decussatus*, para posteriormente estudar o envolvimento da MT nos tecidos desta amêijoia exposta a dois tipos de contaminação: subletal e aguda. Na exposição subletal também se pretende compreender o comportamento desta proteína no processo de depuração deste elemento, e ainda, clarificar se este metal estará ligado à MT ou eventualmente a outras proteínas constituintes da fracção citosólica. Tal como no capítulo anterior, os processos de acumulação e de eliminação foram seguidos em condições controladas na tentativa de ajustar modelos cinéticos que permitam determinar coeficientes, para uma melhor comparação e compreensão dos mecanismos associados aos diferentes tecidos e exposições. Assim, pretende-se responder às seguintes questões:

- (i) Qual a concentração letal de Cu na amêijoia *R. decussatus*?
- (ii) Qual a cinética de acumulação de Cu nos diferentes tecidos de *R. decussatus* e de que forma pode uma exposição subletal e outra aguda influenciar esta cinética? Como pode a indução de MT influenciar a cinética de acumulação de Cu e qual o seu envolvimento numa situação de *stress* causada por uma exposição aguda?
- (iii) Qual a cinética de depuração deste metal nos diferentes tecidos após uma exposição subletal de Cu e o que acontece à MT induzida durante o processo de acumulação?

(iv) Será que os níveis de MT induzidos por Cu na amêijoia *R. decussatus*, podem ser determinados directamente por Polarografia Diferencial com Impulsos (PDI), sem ser necessário recorrer a técnicas cromatográficas para separar os componentes da fracção citosólica, tal como acontece para o Cd?

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

As amêijoas *R. decussatus* (30-35 mm) utilizadas nos ensaios laboratoriais foram recolhidas na Ria Formosa, num local afastado de fontes antrópicas. Durante o período de recolha as amêijoas não se encontravam em fase de maturação. Antes de se iniciarem os ensaios experimentais, os organismos foram transportados para o laboratório e depurados durante 7 dias.

4.2.1.1. ENSAIO DE TOXICIDADE

Para o ensaio de toxicidade com Cu montou-se um circuito experimental, no qual lotes de 50 indivíduos foram expostos a concentrações deste metal de 50, 75, 150, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$, paralelamente manteve-se um controlo experimental. As amêijoas dos diferentes aquários foram observadas diariamente, sensivelmente à mesma hora e durante todo o período experimental. Sempre que ocorreu mortalidade, os animais foram retirados e contados. O critério de mortalidade foi o adoptado por Henry *et al.* (1984), segundo os quais consideram-se mortos os indivíduos que apresentam as valvas completamente abertas ou que não as fecham sobre pressão.

A determinação do tempo de sobrevivência médio (LT_{50})¹ e da concentração média letal (LC_{50})² foi efectuada segundo um modelo logístico. No modelo logístico a probabilidade $P(x)$ de resposta a uma dose x de poluente, exprime-se sob a forma: $P(x) = 1/(1+e^{-(a+bx)})$, em que a e b são duas constantes desconhecidas características da distribuição de tolerâncias. As estimativas a e b são obtidas a partir do ajuste não linear dos mínimos quadrados, onde o valor de LT_{50} estimado é igual a $(-a/b)$. O procedimento acima descrito é semelhante para a estimação do valor de LC_{50} .

¹ LT_{50} - tempo necessário para que metade dos indivíduos morra (Abel, 1989).

² LC_{50} - concentração que provoca a morte de metade dos indivíduos durante um determinado período de tempo (Abel, 1989).

4.2.1.2. Ensaio de acumulação e eliminação

Após a determinação da concentração letal de Cu foi realizada uma outra experiência, em que, um conjunto de amêijoas foi exposto a uma concentração subletal de $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$, durante 40 dias. Após este período de acumulação, os exemplares foram transferidos para água sem Cu durante mais 50 dias.

Um outro conjunto de organismos foi exposto a uma concentração de $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$, a qual os testes de toxicidade revelaram corresponder a uma concentração aguda. Neste ensaio apenas se acompanhou a acumulação de Cu durante 25 dias, uma vez que a partir desse dia a mortalidade atingiu 100%.

Para tal, lotes de 60 indivíduos foram colocados em 9 aquários, com um volume de 10 litros. Três aquários serviram de controlo experimental, três foram contaminados com sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck) numa concentração de $25 \mu\text{g l}^{-1}$ e os outros três com uma concentração de $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Os parâmetros físico-químicos medidos durante as experiências mantiveram-se constantes (Capítulo III – secção 3.2.1)

Retiraram-se aleatoriamente, sem reposição, amostras de seis indivíduos por aquário, após os seguintes dias: 0, 7, 14, 21, 30, 40 (período de acumulação) e nos dias 50, 60, 75 e 90 (período de eliminação) para a exposição a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ e nos dias: 0, 7, 14, 21, 25 (período de acumulação) para a exposição a $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

Os organismos foram dissecados em brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo (manto, pé e músculos adutores). Amostras compostas de seis tecidos foram submetidas ao tratamento referido no Capítulo II (Figura 2.2 - secção 2.2). Em cada uma das fracções isoladas, ou seja, no homogeneizado total e nas diferentes fracções subcelulares (FI, FEPM e FBPM) dos respectivos tecidos, foi determinada a concentração de Cu por EAA com chama ou câmara de grafite, após um pré-tratamento por via húmida (Capítulo III - secção 3.2.1). Enquanto que, os teores de metalotionina (MT) foram determinados na fracção citosólica tratada termicamente (FBPM) de acordo com o método descrito por Bebianno & Langston (1989).

A validação dos resultados da concentração de Cu foi efectuada utilizando materiais de referência certificados, nomeadamente tecido de ostra (NBS) (National Institute

of Standards & Technology) em que, os valores determinados no laboratório são $63,2 \pm 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ comparativamente com valores certificados ($66,3 \pm 4,3 \mu\text{g g}^{-1}$).

As concentrações de MT e de Cu estão expressas em nmol g^{-1} de peso seco do tecido inicialmente homogeneizado. Tal como referido nos capítulos anteriores utilizou-se para a MT uma massa molecular de 7328 Da (Bebianno *et al.*, 2000; Simes *et al.*, 2003).

4.2.1.3. Ensaios cromatográficos

Neste trabalho recorreu-se à cromatografia de filtração em gel (CFG) em algumas amostras da fracção subcelular tratada termicamente (FBPM).

Foi utilizada uma coluna Sephadex G-75 (Pharmacia) (1,5 x 60 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 (com 0,1 mM PMSF e 0,5 mM DTT). A esta coluna foi aplicado o Azul de dextrano e CoCl_2 para determinar o volume morto (V_m) e o volume da fase estacionária (V_s), respectivamente. Após este procedimento foi então efectuada a calibração da coluna com citocromo C, albumina de serum de bovino, criptosinogénio A e com a metalotionina de fígado de coelho MT-1 (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Determinação do volume morto (V_m) e o volume da fase estacionária (V_s) e calibração da coluna.

Composto	Volume aplicado (ml)	Peso Molecular (Da)	Comprimento de onda (nm)	Fracção
Azul dextrano (2 mg/ml)	0,5	2000000	280	15
Albumina de Serum bovino (5 mg/ml)	0,5	66000	280	16
Criptosinogénio A (2 mg/ml)	0,5	25118	280	25
Citocromo C (2 mg/ml)	0,5	12400	480	30
Padrão de MT	0,5	10200	280	32
CoCl_2 (2 mg/ml)	0,5	237,9	280	40

As amostras sujeitas à CFG foram homogeneizadas com Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, contendo 0,1 mM PMSF e 0,5 mM DTT e submetidas ao tratamento referido no

Capítulo II (Figura 2.1) até ser obtida a fracção citosólica de baixo peso molecular tratada termicamente (FBPM).

Aliquotas (0,5 ml) da fracção FBPM dos vários tecidos foram aplicadas na coluna, tendo a eluição decorrido a 4°C, com um gradiente linear do mesmo tampão (Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, com 0,1 mM PMSF e 0,5 mM DTT). O fluxo foi imposto por acção gravítica, controlada pelo caudal de saída da coluna (0,5 ml min⁻¹).

Fracções do eluato (2 ml) foram recolhidas em diferentes tubos. Em cada uma das fracções obtidas foi determinada a absorvância (280 e 270 nm), os teores de Cu directamente por EAA com câmara de grafite sem tratamento prévio e o teor em compostos tiólicos (-SH) por PDI. Na Figura 4.1 encontra-se esquematizado o procedimento atrás descrito.

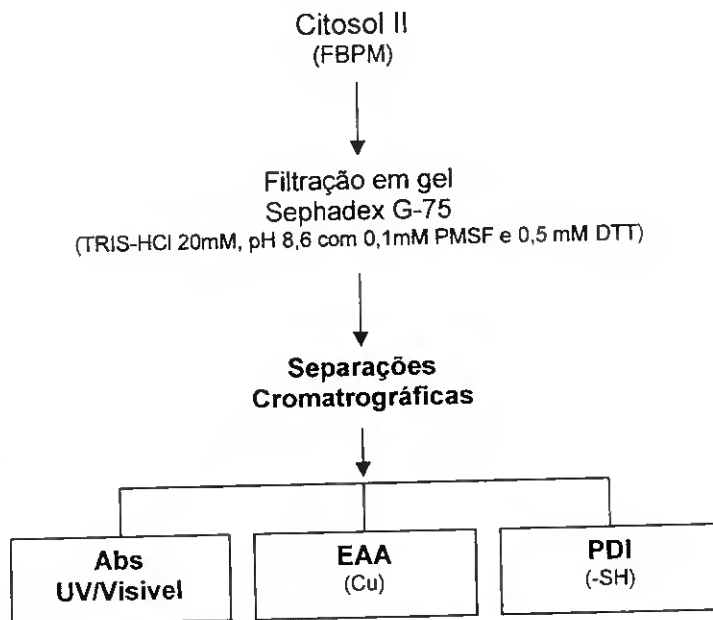


Figura 4.1 - Esquema do procedimento laboratorial utilizado na separação cromatográfica..

4.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variabilidade das concentrações de Cu e de MT ao longo do tempo foi testada nos diferentes tecidos através da análise de variância (ANOVA) a três entradas, considerando como variáveis independentes o tempo, a concentração de Cu a que os organismos foram expostos e o tecido. Para discriminar as diferenças entre cada uma das variáveis foi utilizado o teste de Duncan ($\alpha 0,05$).

Foram também efectuadas análises de regressão, quer entre as concentrações de Cu e de MT com o tempo, quer entre as concentrações de Cu e de MT, para um nível de significância de 0,05.

Aos dados de acumulação e de eliminação de Cu nos tecidos foi aplicado um modelo cinético de 1ª ordem, como descrito no Capítulo III (secção 3.2.2).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. TOXICIDADE DE Cu NA AMÊIJOA *R. decussatus*

A evolução da mortalidade acumulada da amêijoia *R. decussatus*, ao longo do tempo de exposição às diferentes concentrações de Cu, encontra-se na Figura 4.2.

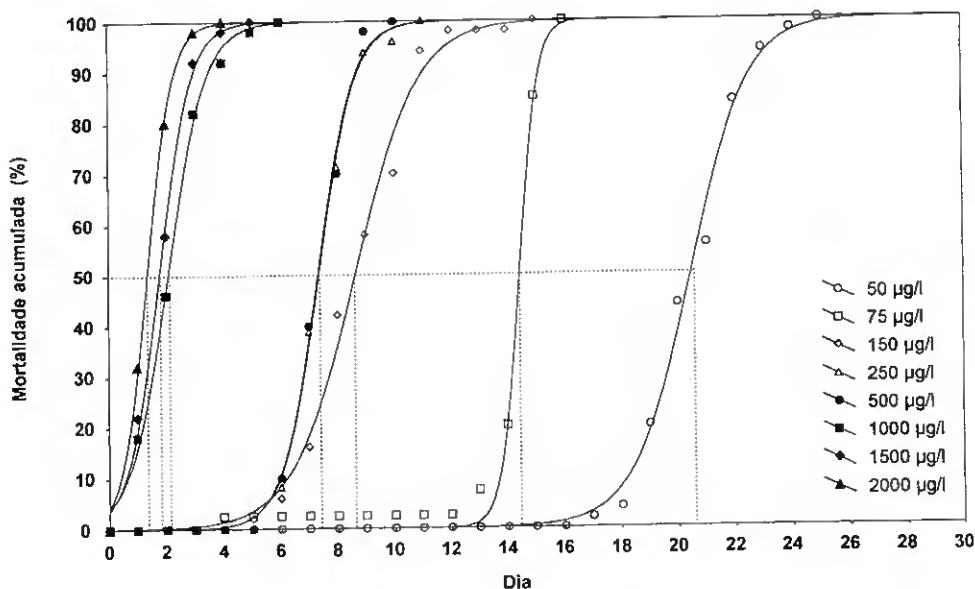


Figura 4.2 - Evolução da percentagem da mortalidade acumulada de indivíduos ao longo do tempo, quando contaminados com diferentes concentrações de cobre (símbolos - pontos observados; linhas a cheio - curvas estimadas).

A análise comparativa das curvas de mortalidade acumulada ao longo do tempo de exposição da amêijoia às diferentes concentrações de Cu (50, 75, 150, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$), mostrou que a mortalidade aumenta com o aumento da concentração testada. Na Figura 4.2, pode ainda observar-se que os ensaios tiveram durações diferentes consoante a concentração utilizada, variando entre o mínimo de 4 dias para a concentração de Cu mais elevada (500 $\mu\text{g l}^{-1}$) e o máximo de 25 dias para a concentração mais baixa (50 $\mu\text{g l}^{-1}$).

Quanto aos valores do tempo de sobrevivência médios (LT_{50}), estimados pelo método logístico, estes apresentam uma evolução decrescente à medida que a concentração aumenta, sendo aproximadamente 20 dias para a concentração de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ decrescendo até 1 dia para a concentração mais elevada de $2000 \mu\text{g l}^{-1}$ (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Tempo de sobrevivência média (LT_{50}) da espécie *R. decussatus*, para as concentrações de Cu testadas.

Concentração ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Equação	LT_{50} (dias)	r
50	$P(x) = 1/(1 + e^{(20,35 - 0,99 x)})$	20,6	0,998
75	$P(x) = 1/(1 + e^{(43,92 - 3,04 x)})$	14,4	0,997
150	$P(x) = 1/(1 + e^{(7,85 - 0,91 x)})$	8,6	0,998
250	$P(x) = 1/(1 + e^{(11,59 - 1,57 x)})$	7,4	0,999
500	$P(x) = 1/(1 + e^{(11,84 - 1,59 x)})$	7,3	0,998
1000	$P(x) = 1/(1 + e^{(3,18 - 1,53 x)})$	2,1	0,998
1500	$P(x) = 1/(1 + e^{(3,25 - 1,83 x)})$	1,8	0,998
2000	$P(x) = 1/(1 + e^{(3,12 - 2,29 x)})$	1,4	0,999

IV

A partir dos valores de concentração média letal (LC_{50}), calculados para cada dia de ensaio através do método logístico, foi possível ajustar a curva de toxicidade do Cu nesta espécie, que apresentou uma evolução exponencial (Figura 4.3).

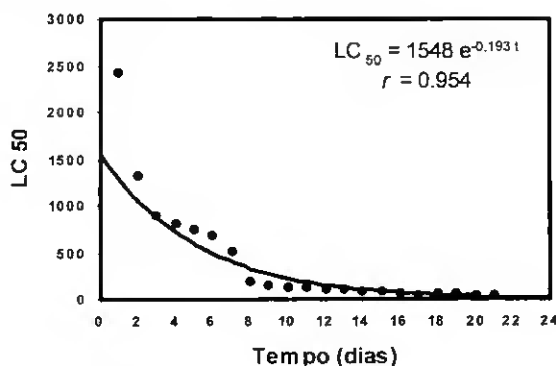


Figura 4.3 - Curva de toxicidade do Cu para a espécie *R. decussatus*.

Através da equação da curva ajustada aos pontos de LC_{50} obtidos para cada dia de ensaio, calculou-se o valor da concentração média letal (LC_{50}) às 96 horas, tendo-se obtido o valor de $715 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu.

4.3.2. CONCENTRAÇÃO DE Cu NOS TECIDOS DA AMÊIJOA *R. decussatus*

A concentração (média $\pm \sigma$) de Cu (nmol g⁻¹) total e nas diferentes frações subcelulares (FI, FEPM e FBPM) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a 25 µg Cu l⁻¹ ao fim de 40 dias de exposição e de 50 dias de depuração (dia 90) e ainda das amêijoas expostas a 50 µg l⁻¹ de Cu ao fim de 25 dias de exposição, encontra-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Concentração de Cu (nmol g⁻¹) (total e nas diferentes frações subcelulares) em diferentes tecidos das amêijoas não contaminada e das expostas a 25 µg l⁻¹ de Cu ao fim 40 dias de exposição e de 50 dias de depuração e ainda das amêijoas expostas a 50 µg l⁻¹ de Cu ao fim de 25 dias de exposição (os valores correspondem média $\pm \sigma$).

	Controlo	25 µg l ⁻¹ Cu		50 µg l ⁻¹ Cu
		Acumulação (40º dia)	Eliminação (90º dia)	Acumulação (25º dia)
Brânquias				
Total	79,0 \pm 9,0	540 \pm 53,9	53,2 \pm 9,0	1098 \pm 143
FI	15,9 \pm 3,9 (19)	171 \pm 18,1 (26)	8,3 \pm 2,0 (16)	381 \pm 38,1 (25)
FEPM	18,6 \pm 7,5 (22)	150 \pm 14,9 (22)	10,3 \pm 1,9 (19)	440 \pm 44,0 (30)
FBPM	50,5 \pm 16,6 (59)	352 \pm 21,9 (52)	34,7 \pm 6,6 (65)	677 \pm 121 (45)
Gl. digestiva				
Total	178 \pm 38,6	2897 \pm 190	82,8 \pm 8,3	2199 \pm 270
FI	30,4 \pm 5,1 (20)	642 \pm 46,3 (22)	17,2 \pm 1,9 (13)	623 \pm 92,3 (22)
FEPM	33,8 \pm 12,3 (42)	473 \pm 39,5 (16)	60,4 \pm 5,9 (46)	757 \pm 85,7 (27)
FBPM	90,6 \pm 13,1 (58)	1782 \pm 86,6 (62)	53,1 \pm 6,0 (41)	1419 \pm 192 (51)
Resto				
Total	62,7 \pm 16,3	338 \pm 23,6	190 \pm 5,9	607 \pm 29,2
FI	27,5 \pm 6,0 (40)	281 \pm 11,0 (47)	151 \pm 6,0 (55)	427 \pm 19,7 (43)
FEPM	22,7 \pm 3,8 (32)	189 \pm 9,5 (31)	105 \pm 4,1 (39)	354 \pm 15,6 (36)
FBPM	19,8 \pm 5,6 (16)	132 \pm 3,2 (22)	16 \pm 2,6 (6)	214 \pm 11,0 (21)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de Cu em cada uma das frações subcelulares.

Os teores de Cu nos três tecidos das amêijoas não contaminadas (Tabela 4.3) não variaram significativamente ao longo do ensaio experimental, quer no total quer nas diferentes frações subcelulares ($p > 0,05$). Tal como na concentração de Cd (Capítulo III), a glândula digestiva foi o tecido com teores mais elevados de Cu, com uma concentração significativamente superior ($p < 0,05$) à observada nas brânquias e na restante parte edível.

A distribuição subcelular de Cu nas brânquias e na glândula digestiva das amêijoas não contaminadas foi distinta da observada na restante parte edível. A concentração

de Cu foi mais elevados na fracção FBPM nas brânquias (59%) e na glândula digestiva (58%). Enquanto que, na restante parte edível foi a fracção FI que apresentou os teores mais elevados (40%). Assim, observou-se a seguinte distribuição: FBPM > FEPM \approx FI nas brânquias e na glândula digestiva e FI > FEPM > FBPM na restante parte do corpo (Tabela 4.3).

Na Figura 4.4 encontra-se a evolução da concentração total de Cu e nas diferentes fracções subcelulares nas brânquias, na glândula digestiva e na restante parte edível das amêijoas expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu durante 40 dias seguidos de 50 dias de depuração e expostas a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu durante 25 dias. Todos os resultados de concentração de Cu obtidos durante os ensaios laboratoriais encontram-se em anexo (Tabelas A.4, A.5 e A.6).

4.3.2.1. Acumulação de Cu

A concentração de Cu (total e fracções subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a 25 e a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ aumentou linearmente e significativamente até ao final do período de exposição ($p < 0,05$), sendo a velocidade de acumulação de Cu significativamente superior nas amêijoas expostas a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($p < 0,05$) (Tabela 4.4 e Figura 4.4).

Tabela 4.4 – Velocidade de acumulação de Cu ($\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$) (total e nas diferentes fracções subcelulares) em diferentes tecidos das amêijoas contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 40 dias e com 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 25 dias. ($p < 0,05$).

		25 $\mu\text{g l}^{-1}$		50 $\mu\text{g l}^{-1}$	
		Velocidade de acumulação ($\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	<i>r</i>	Velocidade de acumulação ($\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	<i>r</i>
Brânquias	Total	12,8	0,972	34,9	0,883
	FI	3,1	0,965	10,8	0,806
	FEPM	3,1	0,999	14,3	0,925
	FBPM	9,2	0,845	22,7	0,964
Gl. digestiva	Total	63,3	0,930	81,0	0,957
	FI	14,9	0,903	23,7	0,926
	FEPM	11,3	0,832	27,4	0,928
	FBPM	36,4	0,875	52,3	0,973
Resto	Total	5,6	0,884	21,4	0,987
	FI	6,2	0,973	12,9	0,910
	FEPM	4,3	0,920	9,4	0,831
	FBPM	2,5	0,899	6,9	0,935

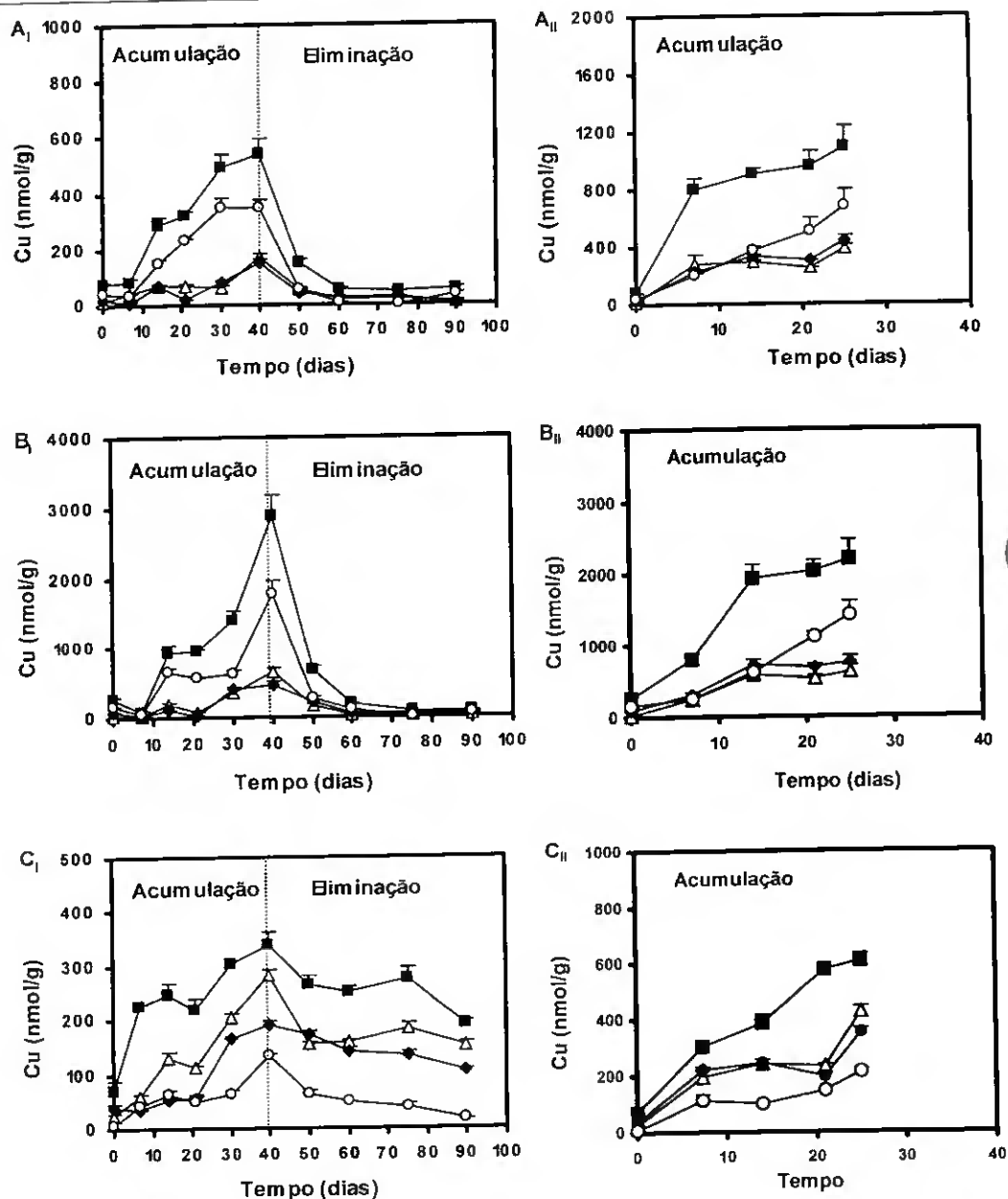


Figura 4.4 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a 25 µg l⁻¹ durante 40 dias e 50 dias de depuração (I) e expostas a 50 µg l⁻¹ durante 25 dias (II). (■ Total; △ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM).

No final do período de exposição a distribuição subcelular de Cu nas brânquias das amêijoas contaminadas alterou-se relativamente às amêijoas não contaminadas. A percentagem de Cu na fracção FI aumentou e na FBPM diminuiu significativamente, em ambas as exposições, enquanto que na fracção FEPM só aumentou na exposição mais elevada ($50 \mu\text{g l}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Tabela 4.3). Apesar da percentagem de Cu não ter aumentado na FBPM, a concentração deste elemento no final do período de exposição aumentou 9 e 17 vezes na exposição a 25 e a $50 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente. O aumento de Cu nesta fracção subcelular pode ser comprovado através dos perfis de eluição cromatográficos da concentração deste metal, obtidos nas diferentes concentrações e tempos de exposição (Figura 4.5).

Na fracção FBPM deste tecido das amêijoas não contaminadas a maior quantidade de Cu ($32,3 \text{ nmol g}^{-1}$ correspondendo a 53%) eluiu entre as fracções 29 a 35, centrada na fracção 32 a qual corresponde ao peso molecular 10,2 KDa coincidente com a eluição da MT, enquanto que nas fracções de elevado e de baixo peso molecular apenas eluíram 30 e 17 % do Cu total, respectivamente (Figura 4.5).

A concentração de Cu, nas fracções anteriormente referidas, variou nas amêijoas expostas a 25 e $50 \mu\text{g l}^{-1}$ ao fim do mesmo tempo de exposição (14 dias) (Figura 4.5-A) e ao longo do tempo para a mesma concentração ($25 \mu\text{g l}^{-1}$) (Figura 4.5-B). De facto, ao fim de 14 dias de exposição a 25 e a $50 \mu\text{g l}^{-1}$, o Cu contido nas fracções 29 a 35 aumentou cerca de 2,8 e 3,5 vezes relativamente às brânquias das amêijoas não contaminadas, correspondendo a uma concentração de 90 nmol g^{-1} na contaminação a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ e de 113 nmol g^{-1} na de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.5-A). No final do período de exposição a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ (dia 40), a concentração de Cu nestas fracções (29-35) continuou a aumentar (4,8 vezes - 154 nmol g^{-1}) relativamente às amêijoas não contaminadas, representando estas fracções 50% do total de Cu eluído (Figura 4.5-B).

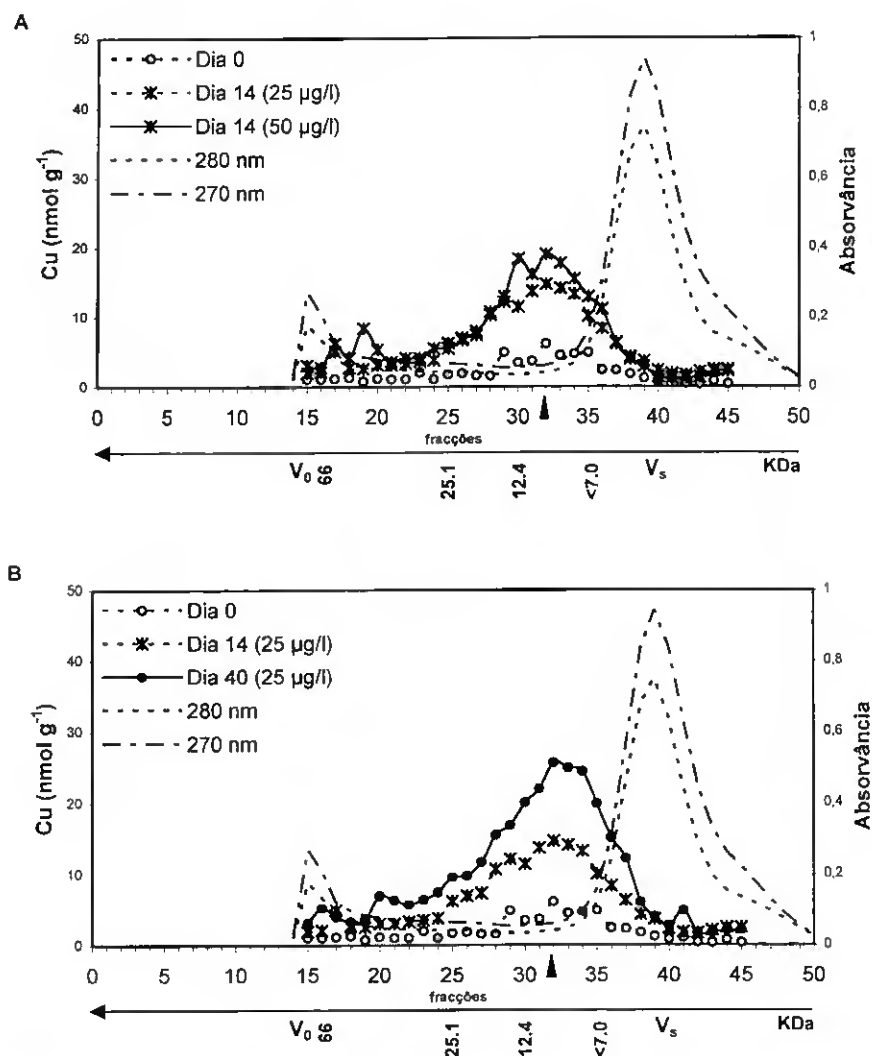


Figura 4.5 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM das brânquias das amêijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 µg Cu l⁻¹ ao fim de 14 dias; B) não contaminadas e contaminadas com 25 µg Cu l⁻¹ ao fim de 14 e 40 dias. (▲ fração onde eluiu a MT).

À semelhança das brânquias, o Cu foi acumulado linearmente na glândula digestiva (total e frações subcelulares) durante o período de exposição, em ambas as contaminações com Cu (Figura 4.4-B_I e B_{II}), tendo este tecido acumulado os teores de Cu total com velocidades significativamente superiores às observadas nas brânquias (Tabela 4.4). Tal como nas brânquias, no final do período de exposição a distribuição subcelular de Cu na glândula digestiva das amêijoas contaminadas alterou-se relativamente às amêijoas não contaminadas. A percentagem de Cu na fração FI também aumentou em ambas as exposições, enquanto que na fração FEPM só aumentou significativamente na exposição mais elevada ($50 \mu\text{g l}^{-1}$) ($p < 0,05$). Por outro lado, na fração FBPM a percentagem deste elemento aumentou na exposição a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ e diminuiu na de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (Tabela 4.3). O aumento da concentração de Cu também pode ser observado nos perfis cromatográficos deste elemento na fração FBPM da glândula digestiva (Figura 4.6).

IV

A maior quantidade de Cu (91 nmol g^{-1} correspondendo a cerca de 47%) na fração FBPM da glândula digestiva das amêijoas não contaminadas, tal como nas brânquias, eluiu entre as frações 29 a 35, no entanto centrada na fração 30 a qual corresponde a 12.9 KDa. Ao fim de 14 dias de exposição a 25 e a $50 \mu\text{g l}^{-1}$, o Cu nestas frações aumentou cerca de 3 e 4 vezes relativamente aos da fração subcelular FBPM das amêijoas não contaminadas (242 nmol g^{-1} na exposição a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ e 361 nmol g^{-1} na exposição a $50 \mu\text{g l}^{-1}$) (Figura 4.6-A). Enquanto que, no final do período de exposição a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ (dia 40), a concentração de Cu nestas frações (534 nmol g^{-1}) aumentou 6 vezes (Figura 4.6-B).

Apesar da maior quantidade de Cu na FBPM da glândula digestiva ter eluido nas mesmas frações que nas brânquias, a concentração de Cu na glândula digestiva foi superior. No início dos ensaios (dia 0) os teores de Cu (frações 29–35) na glândula digestiva foram cerca de 3 vezes superiores aos das brânquias (Figuras 4.5 e 4.6).

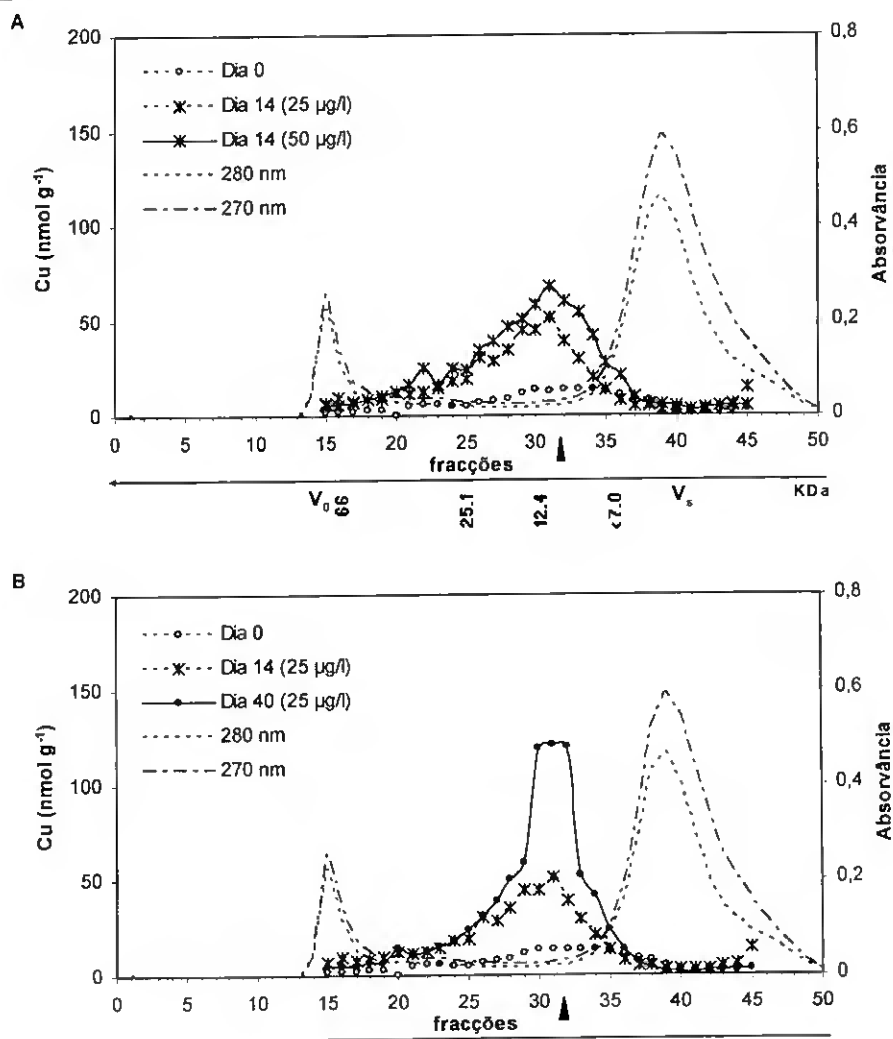


Figura 4.6 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM da glândula digestiva das amêijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 µg Cu l⁻¹ ao fim de 14 dias; B) não contaminadas e contaminadas com 25 µg Cu l⁻¹ ao fim de 14 e 40 dias. (▲ fração onde eluiu a MT).

Tal como nos tecidos anteriores, o Cu (total e frações subcelulares) também foi acumulado linearmente na restante parte edível das amêijoas, em ambas as exposições e durante todo o período de contaminação (Figura 4.4-C_I e C_{II}). No entanto, a velocidade de acumulação de Cu foi significativamente inferior comparativamente com os outros dois tecidos (Tabela 4.4).

A distribuição subcelular de Cu no final do período de exposição na restante parte edível das amêijoas contaminadas, também se alterou relativamente à das amêijoas não contaminadas. Apesar da percentagem de Cu na fração FI continuar a ser a fração com percentagens de Cu mais elevadas, na FBPM a percentagem deste elemento aumentou significativamente, em ambas as exposições ($p < 0,05$). À semelhança dos outros tecidos, o aumento de Cu na FBPM pode ser comprovado nos perfis cromatográficos (Figura 4.7).

A maior quantidade de Cu na restante parte edível das amêijoas não contaminadas também eluiu entre as frações 29 e 35 (10 nmol g^{-1} correspondendo a cerca de 40% do Cu total). No entanto, a concentração de Cu na restante parte edível foi a mais baixa dos três tecidos, sendo cerca de 3 vezes inferior à observada nas brânquias e de 9 vezes na glândula digestiva (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7).

Ao fim de 14 dias de exposição a 25 e a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$, o Cu nessas frações aumentou relativamente aos níveis de Cu encontrados na fração subcelular FBPM das amêijoas não contaminadas, cerca de 2,5 e 6,4 vezes, respectivamente (26 nmol g^{-1} na exposição a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ e 42 nmol g^{-1} na exposição a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Figura 4.7-A). Enquanto que, no final do período de exposição a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (dia 40), a concentração de Cu nas mesmas frações (29-35) aumentou cerca 5 vezes (56 nmol g^{-1}) (Figura 4.7-B).

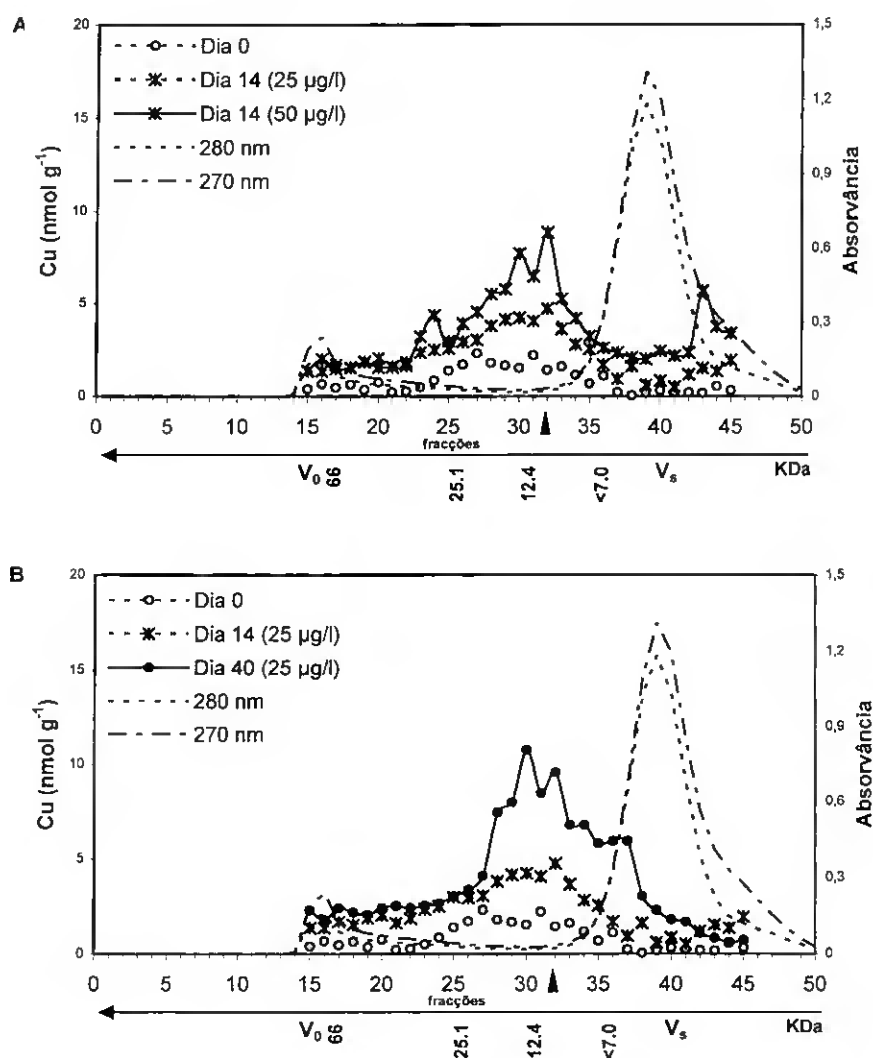


Figura 4.7 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 µg Cu l⁻¹ ao fim de 14 dias; B) não contaminadas e contaminadas com 25 µg Cu l⁻¹ ao fim de 14 e 40 dias. (▲ fração onde eluiu a MT).

Tal como para os dados de Cd (Capítulo III), foi ajustado um modelo cinético de 1ª ordem aos dados da concentração de Cu, nos diferentes tecidos de *R. decussatus*, para verificar se com o tempo de exposição os teores de Cu tinham atingido um equilíbrio. Este tipo de ajuste só foi significativo nos tecidos das amêijoas expostas à concentração mais elevada ($50 \mu\text{g l}^{-1}$) no total e nas fracções subcelulares FI e FEPM (Figura 4.8). Os coeficientes de correlação resultantes deste ajuste foram superiores aos dos ajustes lineares, mostrando que este tipo de modelo se ajusta melhor a estes dados.

Nestes tecidos (total e fracções subcelulares FI e FEPM), foi possível calcular, as taxas de assimilação e de depuração de Cu, durante o período em que os organismos estiveram expostos a este metal (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Factor de bioconcentração ($\text{FBC} = K_a/K_d$), taxa constante de assimilação (K_a) e taxa constante de depuração (K_d) nos diferentes tecidos (total e fracções subcelulares) das amêijoas expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu durante 25 dias.

	50 $\mu\text{g l}^{-1}$			
	FBC	K_a (dia^{-1})	K_d (dia^{-1})	r
Brânquias				
Total	1304	262,9	0,202	0,966
FI	395	124,8	0,316	0,913
FEPM	537	54,7	0,102	0,949
FBPM	-	-	-	-
Gl. digestiva				
Total	3576	229,6	0,064	0,952
FI	904	73,6	0,081	0,949
FEPM	1110	94,4	0,085	0,944
FBPM	-	-	-	-
Resto				
Total	1014	57,7	0,057	0,971
FI	634	31,8	0,050	0,890
FEPM	352	68,5	0,194	0,853
FBPM	-	-	-	-

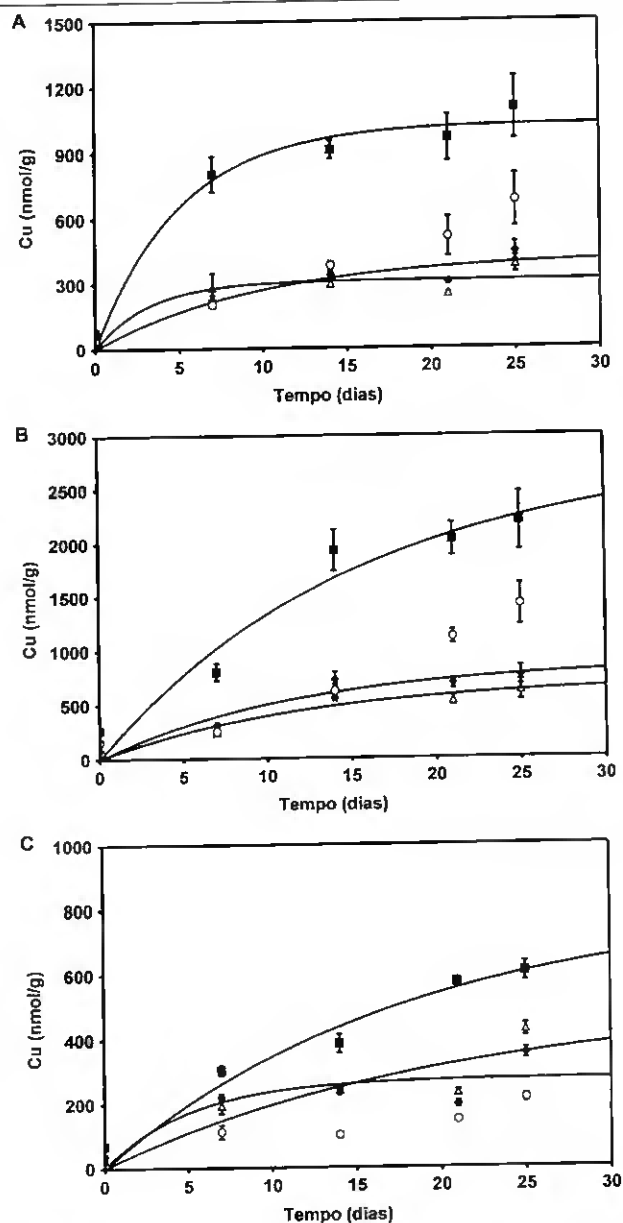


Figura 4.8 – Concentrações de Cu (média $\pm \sigma$) (total e nas diferentes frações subcelulares) experimentais e evolução prevista no modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias (A) glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 25 dias. (■ Total; Δ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM).

De uma forma geral, verificou-se que o Cu foi acumulado pelos tecidos de *R. decussatus*, em ambas as exposições (25 e 50 $\mu\text{g l}^{-1}$). No entanto, na exposição de Cu mais elevada os teores deste elemento tendem a atingir um equilíbrio, como demonstrado pela aplicação do modelo cinético. Desta forma, este modelo permitiu mostrar que no caso da exposição aguda (50 $\mu\text{g l}^{-1}$) o Cu tende a saturar os ligandos nas frações subcelulares FI e FEPM, mas não na FBPM, na qual se encontram as MTs.

4.3.2.2. Eliminação de Cu

Durante o período de depuração (40° - 90° dia), as brânquias das amêijoas pré-expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (Figura 4.4-A₁) eliminaram exponencialmente os teores deste metal (Tabela 4.6), atingindo uma concentração de $53,2 \pm 9,0 \text{ nmol g}^{-1}$ ao fim de 50 dias de depuração, correspondendo a uma eliminação de 90% do total de Cu acumulado. Os teores de Cu nas diferentes frações subcelulares, também foram eliminados exponencialmente durante o período de depuração (Tabela 4.6), tendo cada uma destas frações eliminado aproximadamente 90% do Cu acumulado.

Tabela 4.6 – Equações exponenciais de eliminação de Cu nos diferentes tecidos (total e frações subcelulares) das amêijoas pré-expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu.

25 $\mu\text{g l}^{-1}$		
	Equação ($\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	r
Brânquias		
Total	$\text{Cu} = 1586 e^{-0,04 t}$	0,831
FI	$\text{Cu} = 1007 e^{-0,05 t}$	0,948
FEPM	$\text{Cu} = 582 e^{-0,05 t}$	0,922
FBPM	$\text{Cu} = 513 e^{-0,05 t}$	0,540
Gl. digestiva		
Total	$\text{Cu} = 25881 e^{-0,07 t}$	0,914
FI	$\text{Cu} = 5103 e^{-0,07 t}$	0,904
FEPM	$\text{Cu} = 1479 e^{-0,04 t}$	0,792
FBPM	$\text{Cu} = 16952 e^{-0,08 t}$	0,816
Resto		
Total	$\text{Cu} = 451 e^{-0,009 t}$	0,845
FI	$\text{Cu} = 295 e^{-0,008 t}$	0,599
FEPM	$\text{Cu} = 301 e^{-0,012 t}$	0,984
FBPM	$\text{Cu} = 513 e^{-0,04 t}$	0,968

O perfil cromatográfico da eliminação de Cu, no final do período de depuração (dia 90) na FBPM das brânquias das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$, apresenta-se na Figura 4.9-A. Apesar da maior quantidade de Cu eluir nas frações 29 a 35 (51%), a concentração deste elemento (24 nmol g^{-1}) diminuiu cerca de 6 vezes relativamente ao acumulado no final do período de exposição, tendo sido eliminado todo o Cu acumulado nestas frações.

Na glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.4-B₁), a concentração de Cu, total e nas diferentes frações subcelulares, foi também eliminada exponencialmente durante os 50 dias de depuração (Tabela 4.6). Este tecido eliminou 97% do Cu total acumulado, tendo todas as frações subcelulares também eliminado mais de 85% de Cu.

Tal como nas brânquias, o perfil cromatográfico na glândula digestiva mostra a diminuição da quantidade de Cu eliminada na fração FBPM (Figura 4.9-B). A maior quantidade de Cu também eluiu nas frações 29-35 (45%), atingindo uma concentração de 97 nmol g^{-1} , que corresponde a uma redução de 99% relativamente à acumulada após 40 dias de exposição (Figura 4.9-B).

À semelhança dos dois tecidos referidos anteriormente, os teores de Cu (total e frações subcelulares) acumulados na restante parte edível das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.4-C₁) também decresceram exponencialmente, durante o período de depuração (Tabela 4.6). No entanto, este tecido apenas conseguiu eliminar aproximadamente 45% do Cu acumulado, quer no total quer nas diferentes frações subcelulares, à excepção da FBPM a qual eliminou 88% de Cu acumulado.

O perfil cromatográfico na FBPM da eliminação de Cu, no final do período de depuração, encontra-se na Figura 4.9-C. Apesar da maior quantidade de Cu ter sido detectada nas frações 29 a 35 (40%), a concentração deste elemento (14.6 nmol g^{-1}) foi cerca de 4 vezes inferior à acumulada no final do período de exposição, correspondendo a uma redução 91% (Figura 4.9-C).

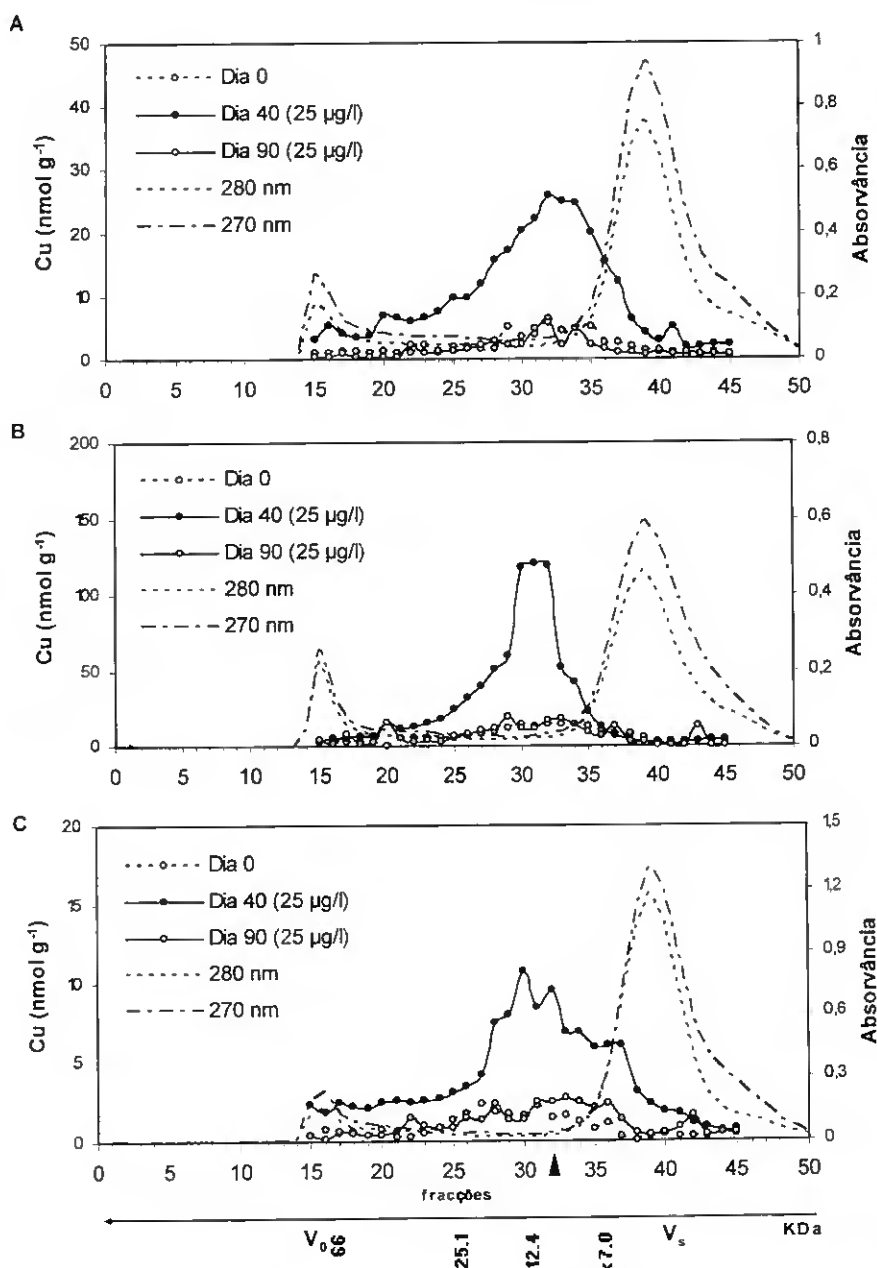


Figura 4.9 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Cu na fração FBPM das brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas não contaminadas e contaminadas com 25 µg Cu l⁻¹ ao fim de 40 dias e depuradas durante 50 dias. (▲ fração onde eluiu a MT).

Aos dados experimentais de eliminação de Cu, nos tecidos das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$, também foi aplicado o modelo cinético de 1ª ordem, (Figura 4.10). Aos tecidos a que foi possível aplicar o modelo determinou-se a taxa de depuração (K_d) e o tempo de meia vida deste elemento ($t_{1/2}$) (Tabela 4.7).

Os teores de Cu nas brânquias e na glândula digestiva de *R. decussatus* foram eliminados mais rapidamente que na restante parte edível. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) calculado na restante parte edível foi de 12 dias, enquanto nas brânquias e na glândula digestiva foi de 6 e 5 dias, respectivamente (Tabela 4.7).

Nas diferentes frações subcelulares das brânquias e da glândula digestiva, o Cu na fração FBPM é eliminado mais rapidamente (com um tempo de meia vida de 4 dias), enquanto que na fração FEPM o Cu é mais dificilmente eliminado (tempo de meia vida de 7 e 8 dias nas brânquias e na glândula digestiva, respectivamente). Na restante parte edível observa-se um comportamento diferente, em que o tempo de meia vida na fração FBPM é superior relativamente às outras frações (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Concentração inicial de Cu (C_i), taxa constante de eliminação (K_e) e tempo de meia-vida $t_{1/2}$ (no total e nas frações subcelulares) dos diferentes tecidos das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu e depuradas durante 50 dias.

	C_i (nmol g^{-1})	K_e (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dia)	r
Brânquias				
Total	$540 \pm 53,9$	0,121	6	0,982
FI	$171 \pm 18,1$	0,103	7	0,983
FEPM	$150 \pm 14,9$	0,105	7	0,964
FBPM	$352 \pm 21,9$	0,190	4	0,991
Gl. Digestiva				
Total	2897 ± 190	0,143	5	0,994
FI	$642 \pm 46,3$	0,132	5	0,992
FEPM	$473 \pm 39,5$	0,082	8	0,972
FBPM	$1782 \pm 86,6$	0,180	4	0,994
Resto				
Total	$338 \pm 23,6$	0,011	12	0,772
FI	$281 \pm 11,0$	0,017	14	0,371
FEPM	$189 \pm 9,5$	0,011	4	0,968
FBPM	$132 \pm 3,2$	0,048	17	0,957

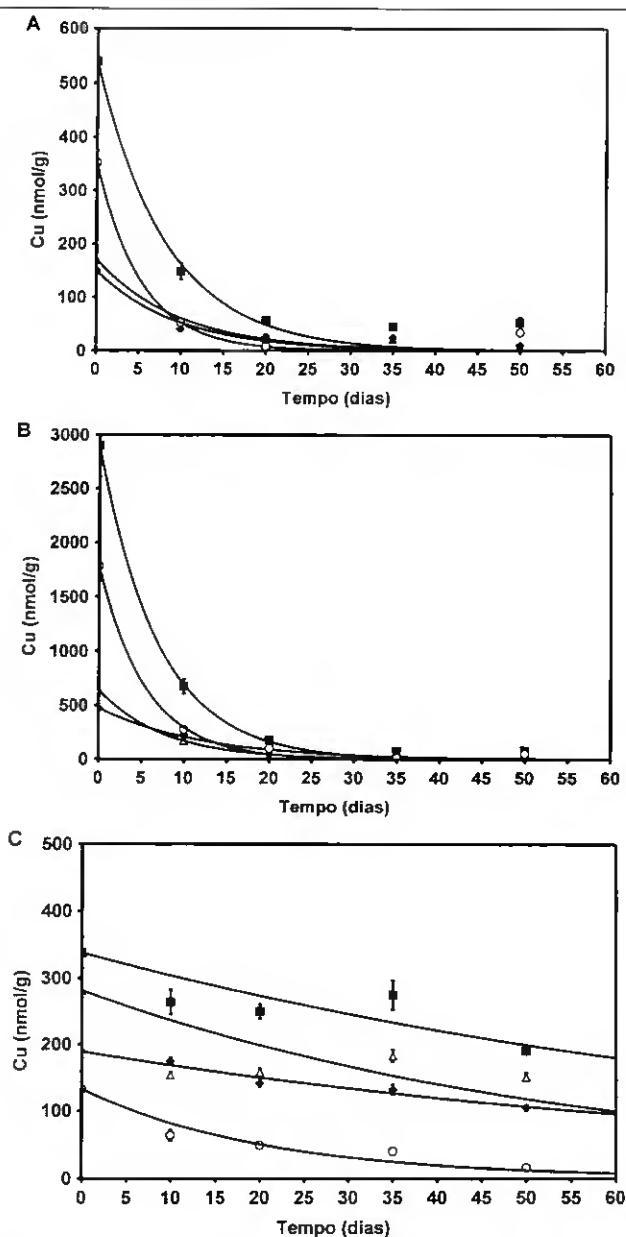


Figura 4.10 - Concentrações de Cu (média $\pm \sigma$) (total e nas frações subcelulares) experimentais e evolução prevista pelo modelo cinético de 1ª ordem, nas brânquias (A) glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ durante de 50 dias de depuração. (■ Total; △ FI; ♦ FEPM; ○ FBPM).

4.3.3. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

A concentração de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu durante 40 dias seguidos de 50 dias de depuração e nas expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu durante 25 dias, encontra-se na Figura 4.11. Todos os dados da concentração desta proteína, obtidos durante os ensaios laboratoriais encontram-se em anexo (Tabela A.13).

Os teores médios ($\pm \sigma$) de MT nos três tecidos das amêijoas não contaminadas ($347 \pm 29 \text{ nmol g}^{-1}$ nas brânquias, $666 \pm 84 \text{ nmol g}^{-1}$ na glândula digestiva e $229 \pm 42 \text{ nmol g}^{-1}$ na restante parte edível) não variaram significativamente durante o ensaio experimental ($p > 0,05$), excepto na glândula digestiva em que a concentração de MT no 90º dia de ensaio foi significativamente inferior aos teores médios registados nos restantes dias. À semelhança dos teores de Cu, a glândula digestiva corresponde ao tecido que apresenta teores desta proteína mais elevados, sendo significativamente superiores comparativamente com os observados nas brânquias e na restante parte edível ($p > 0,05$), tal como já tinha sido detectado na experiência efectuada com Cd (Capítulo III).

4.3.3.1. Indução de MT

Os teores de MT nas brânquias das amêijoas expostas a 25 e a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (Figura 4.11-A) aumentaram linearmente durante o período de exposição. No entanto, na exposição à concentração de Cu mais elevada esse aumento linear só foi observado até ao 21º dia de exposição. As velocidades de indução foram de $12,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,920$; $p > 0,05$) e de $26,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,995$; $p > 0,05$), nas brânquias das amêijoas expostas a 25 e a $50 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente.

A indução de MT nas brânquias das amêijoas expostas ao Cu pode ser comprovada com o aumento da resposta polarográfica dos compostos tiólicos determinados após eluição cromatográfica da fracção FBPM deste tecido, em ambas as exposições e ao longo do tempo de exposição (dias 0, 14 e 40) (Figura 4.12).

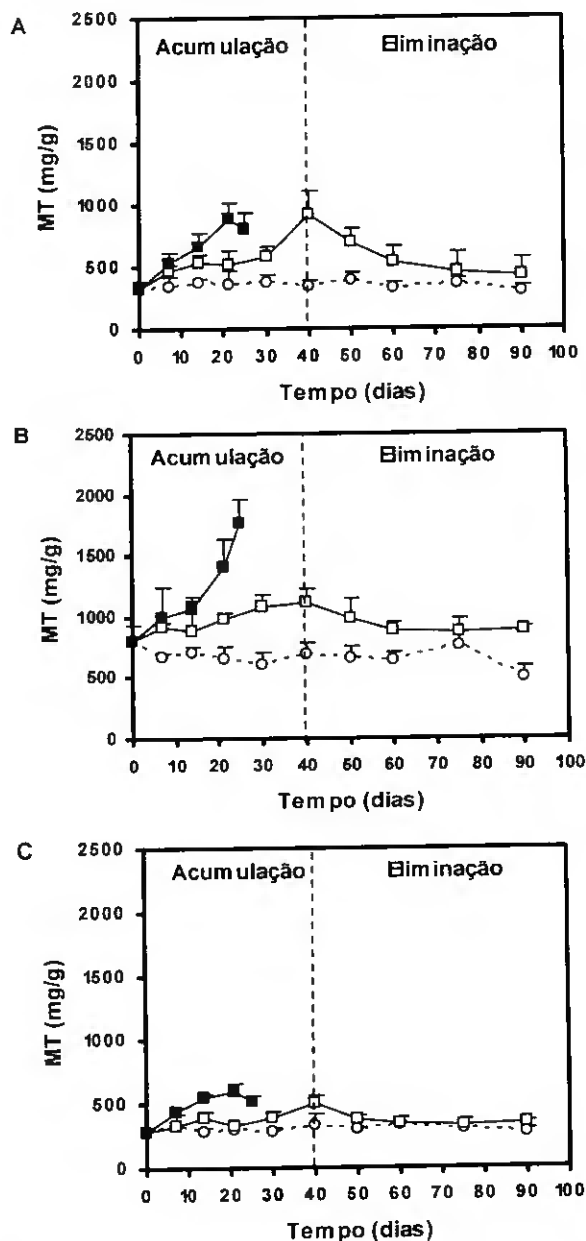


Figura 4.11- Concentração (média \pm σ) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), das amêijoas não contaminadas, expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 40 dias seguidas de 50 dias de depuração e expostas a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ durante 25 dias. (○ controle; □ $25 \mu\text{g l}^{-1}$; ■ $50 \mu\text{g l}^{-1}$).

A resposta polarográfica dos compostos tiólicos da fracção FBPM, nas brânquias das amêijoas não contaminadas mostrou que a maior quantidade de grupos -SH ($328 \mu\text{A g}^{-1}$, correspondendo a 58% do total eluído) foi detectada nas fracções 25-35, centrada na fracção 32, a qual corresponde à eluição do padrão de MT, com um peso molecular de 10,2 KDa. Os restantes grupos de -SH distribuíram-se uniformemente pelas fracções de elevado peso molecular (22%) e de baixo peso molecular (20%) (Figura 4.12).

Durante o período de exposição, verificou-se um aumento da resposta polarográfica nas fracções 25-35, no entanto, para as diferentes exposições no mesmo dia (14º dia) (Figura 4.12-A), apesar da quantidade de grupos tiólicos ser superior na exposição a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ relativamente à de $25 \mu\text{g l}^{-1}$, esse aumento não foi tão acentuado como o observado na concentração de Cu (Figura 4.5-A), o mesmo não se verificou com o aumento do tempo de exposição para a mesma concentração ($25 \mu\text{g l}^{-1}$) (Figura 4.12-B), em que o aumento da quantidade de grupos tiólicos acompanhou a concentração de Cu, sendo a resposta polarográfica máxima no dia 40 ($936 \mu\text{A g}^{-1}$, correspondendo a um aumento de cerca de 3 vezes relativamente ao controlo) e centrada na fracção 32, tal como se verificara para o perfil cromatográfico do Cu no mesmo período (Figuras 4.5 B).

Nas fracções 25 a 35, os valores das absorvâncias a 280 nm foram baixos, consistentes com a ausência de aminoácidos aromáticos na composição da MT. Nestas fracções foi também detectada uma banda de absorção a 270 nm, atribuída à transferência electrónica da ligação Cu-S e indicativo de uma coordenação do Cu a ligandos de enxofre (Vašák *et al.*, 1987). Durante o período de exposição, a razão das absorvâncias 270:280 nm aumentou relativamente ao controlo, sendo máxima na fracção 32 do dia 40 (exposição a $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$) com um valor de 2,2, tendo diminuído para 1,2 no final do período de depuração (dia 90).

A razão das absorvâncias característica da MT nas fracções 25 a 35, conjuntamente com o aumento da concentração de Cu ao longo do tempo de exposição e o aumento da presença de compostos -SH, confirmam que a MT foi induzida nas brânquias das amêijoas expostas a ambas as concentrações de Cu (25 e $50 \mu\text{g l}^{-1}$).

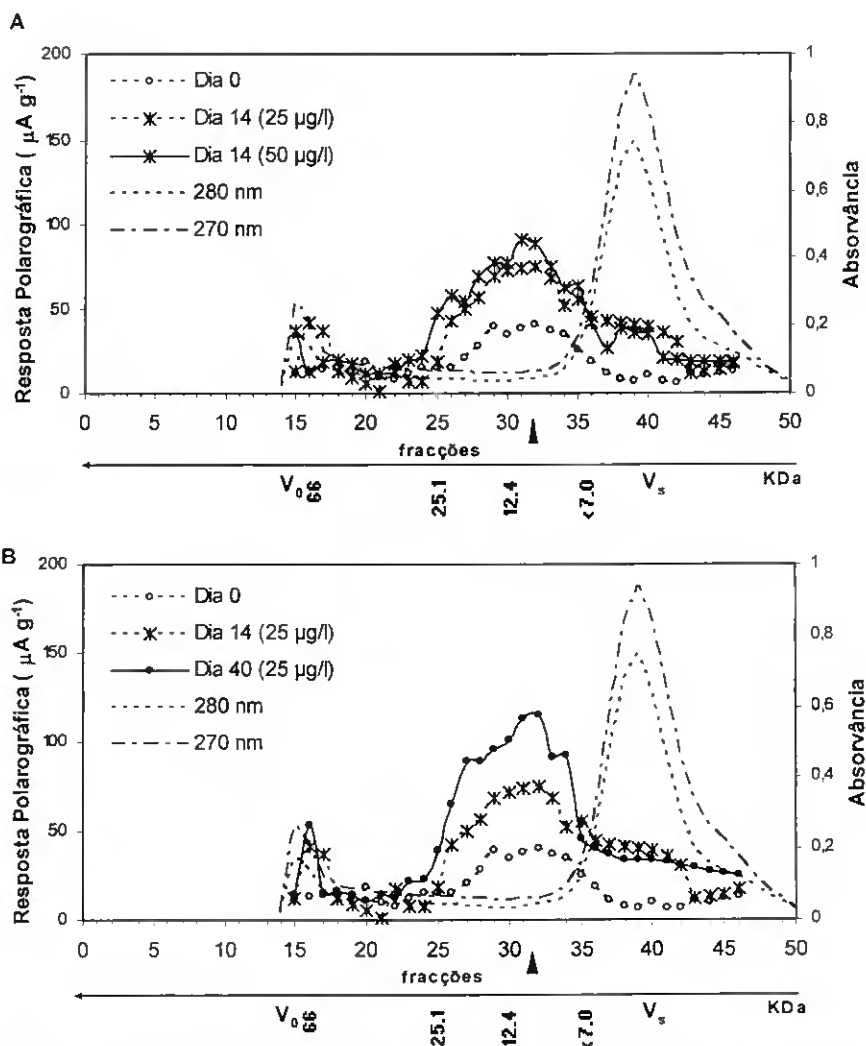


Figura 4.12 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fracção FBPM das brânquias das ameijoas: A) não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 $\mu\text{g Cu I}^{-1}$ ao fim de 14 dias de exposição; B) não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu I}^{-1}$ após 14 e 40 dias de exposição. (\blacktriangle fracção onde eluiu a MT).

Tal como nas brânquias, a síntese de MT foi também induzida na glândula digestiva, em ambas as exposições. No entanto, neste tecido das ameijoas expostas a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ a

MT aumentou linearmente, com uma velocidade de indução de $7,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,970$; $p<0,05$), enquanto que, nas expostas a $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ a MT aumentou exponencialmente ($\text{MT} = 780 e^{0,03t}$, $r=0,971$; $p<0,05$), atingindo uma concentração de $1763 \pm 204 \text{ nmol g}^{-1}$ no 25º dia de ensaio (Figura 4.11-B).

A indução de MT na glândula digestiva, também pode ser observada através da resposta polarográfica dos compostos tiólicos da FBPM obtida após a cromatografia em gel (Figura 4.13). A resposta polarográfica na fracção FBPM da glândula digestiva das amêijoas não contaminadas mostrou, à semelhança das brânquias, que a maior quantidade de grupos -SH ($758 \text{ } \mu\text{A g}^{-1}$ correspondendo a 51% do total eluído) foi encontrada nas fracções 25-35, nas quais se encontram a MT. Os restantes grupos de -SH distribuíram-se pelas fracções de elevado peso molecular (31%) e pelas fracções de baixo peso molecular (18%) (Figura 4.13).

Durante o período de exposição, tal como nas brânquias, a quantidade de grupos tiólicos é superior na exposição a $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ relativamente a $25 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ no mesmo dia de exposição (14º dia) (Figura 4.13-A), no entanto esse aumento não é significativo ($p<0,05$). Por outro lado, o aumento da quantidade de grupos tiólicos neste tecido pode ser observado ao longo do tempo de exposição para a mesma concentração ($25 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) (Figura 4.13-B), em que, a resposta máxima ocorreu no 40º dia de exposição a $25 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ ($1072 \text{ } \mu\text{A g}^{-1}$), com teores de 1,5 vezes superior relativamente ao controlo. A concentração máxima de Cu também foi atingida nesse dia, no entanto, o aumento observado na resposta polarográfica foi inferior ao da concentração de Cu (Figuras 4.6 e 4.13).

Contrariamente ao observado nas brânquias, na glândula digestiva não foram detectadas diferenças na razão das absorvâncias 270:280 nm nas fracções de 25 a 35. No entanto, o aumento da concentração de Cu (nas duas exposições e ao longo do tempo de exposição) e o acompanhamento da resposta polarográfica (resíduos de -SH), parecem indicar que os teores de MT neste tecido foram induzidos pelos níveis de Cu acumulados.

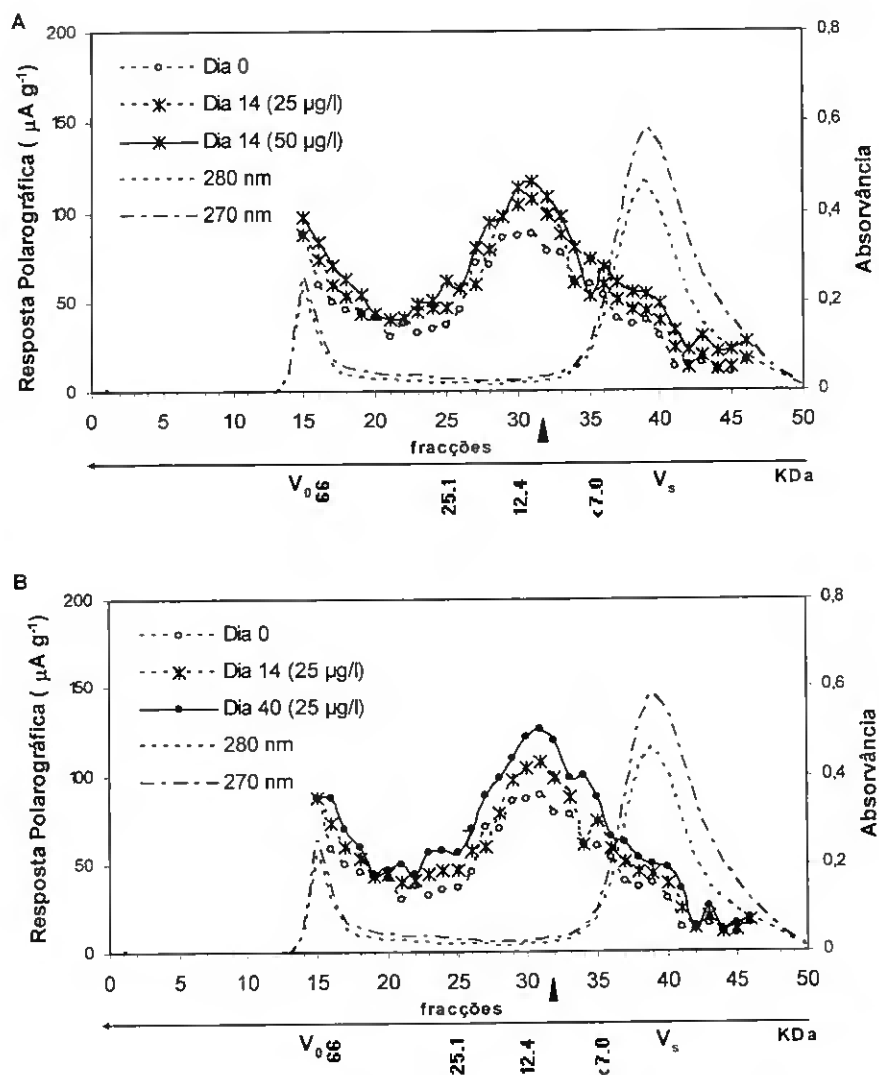


Figura 4.13 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM da glândula digestiva das amêijoas: **A)** não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias de exposição; **B)** não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ após 14 e 40 dias de exposição. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT).

A indução da síntese de MT na restante parte edível das amêijoas expostas a 25 e a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (Figura 4.11-C), apresentou uma evolução idêntica à observada nas brânquias. No entanto, com velocidades de indução significativamente inferiores (4,7 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,895$) e 14,9 $\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r=0,967$), para a exposição de 25 e a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente).

Tal como nos tecidos anteriores, a indução da síntese de MT na restante parte edível pode ser comprovada com os resultados dos perfis cromatográficos da fracção FBPM (Figura 4.14).

A resposta polarográfica dos compostos tiólicos na fracção FBPM da restante parte edível das amêijoas não contaminadas, mostrou que a maior quantidade de grupos –SH (219 $\mu\text{A g}^{-1}$ correspondente a 60% do total eluído) se encontram, à semelhança dos outros tecidos, entre as fracções 25 e 35, com a resposta máxima centrada na fracção 32. Os restantes grupos de –SH distribuem-se uniformemente pelas fracções de elevado e baixo peso molecular (~ 20%). A resposta polarográfica nestas fracções foi cerca de 1,5 inferior comparativamente com as brânquias e cerca de 3,5 vezes inferior à da glândula digestiva (Figuras 4.12, 4.13 e 4.14).

Durante o período de exposição, verificou-se um aumento da resposta polarográfica nas fracções 25-35, para as diferentes exposições no mesmo dia (14º dia), tendo aumentado relativamente ao controlo cerca de 2 e 2,5 nas exposições a 25 e 50 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente (Figura 4.14-A). O aumento da quantidade de grupos tiólicos também foi observado ao longo do tempo na exposição a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.14-B), esse aumento acompanhou a concentração de Cu, sendo a resposta polarográfica máxima no dia 40 (610 $\mu\text{A g}^{-1}$, correspondendo a um aumento de cerca de 3 vezes relativamente ao controlo) e centrada na fracção 32, tal como se verificara para o perfil cromatográfico do Cu no mesmo período (Figuras 4.7 B).

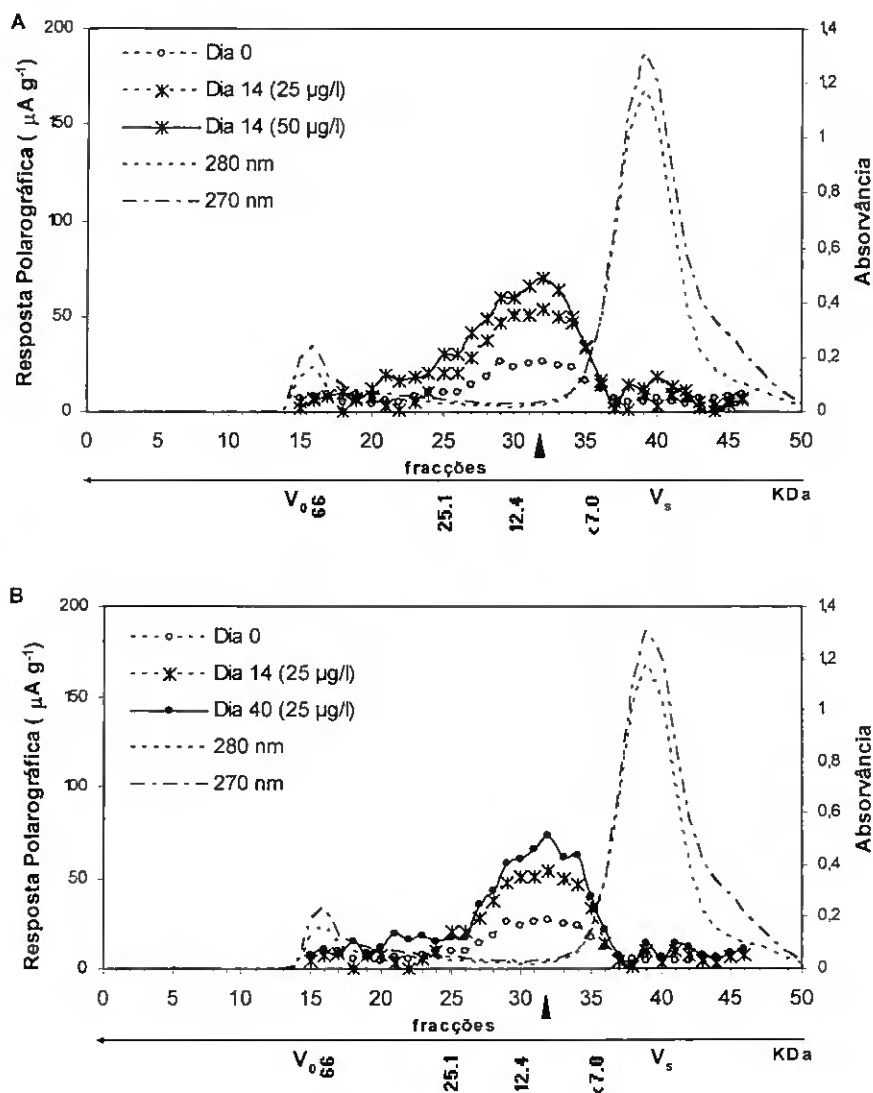


Figura 4.14 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM da restante parte edível das ameijoas: **A)** não contaminadas e contaminadas com 25 e 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 14 dias de exposição; **B)** não contaminadas e contaminadas com 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ após 14 e 40 dias de exposição. (\blacktriangle fração onde eluiu a MT).

De uma forma geral, verificou-se que a resposta polarográfica na fracção FBPM nos três tecidos foi superior a 50% nas fracções correspondentes à MT. No entanto, a indução de MT apresenta um comportamento distinto nestes tecidos. As brânquias correspondem ao tecido em que esta proteína sofre um maior incremento relativamente aos teores de Cu acumulados, sendo a resposta da indução de MT dependente da concentração e do tempo de exposição. Por outro lado, na glândula digestiva, apesar de apresentar um maior teor em conteúdos tiólicos, o aumento destes compostos não foram dependentes das concentrações testadas, mas sim do tempo de exposição, contudo com um incremento inferior relativamente ao observado nos outros dois tecidos. Por último, na restante parte edível a indução de MT apresenta um comportamento semelhante ao das brânquias, embora o aumento não seja tão acentuado ao longo do tempo como o observado nesse tecido.

4.3.3.2. Eliminação

Durante o período de eliminação os teores de MT nas brânquias das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (Figura 4.11-A), decresceram exponencialmente ($MT = 824 e^{-0.016t}$; $r=0,948$; $p<0,05$), atingindo uma concentração de $420 \pm 142 \text{ nmol g}^{-1}$ no último dia de depuração, o que corresponde a um decréscimo de 87%. O tempo de meia vida calculado para esta proteína neste tecido foi de 18 dias.

A diminuição da resposta polarográfica verificada para os compostos tiólicos no perfil cromatográfico da fracção FBPM das brânquias, no final do período de depuração (dia 90) (Figura 4.15-A) evidência que a quantidade de grupos tiólicos induzidos durante o período de exposição foram completamente degradados, sendo a resposta polarográfica nas fracções 25-35 inferior à observada no início do ensaio. A diminuição verificada de grupos -SH também foi acompanhada pela eliminação da concentração de Cu nestas fracções (Figura 4.9-A e 4.15-A).

Os teores de MT na glândula digestiva durante o período de eliminação (Figura 4.11-B) decresceram linearmente ($4,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $r=0,819$; $p<0,05$), atingindo uma concentração de $876 \pm 43 \text{ nmol g}^{-1}$ ao fim de 50 dias de depuração, correspondente a um decréscimo de 75% dos teores induzidos. O tempo de meia vida calculado para esta proteína foi de 20 dias.

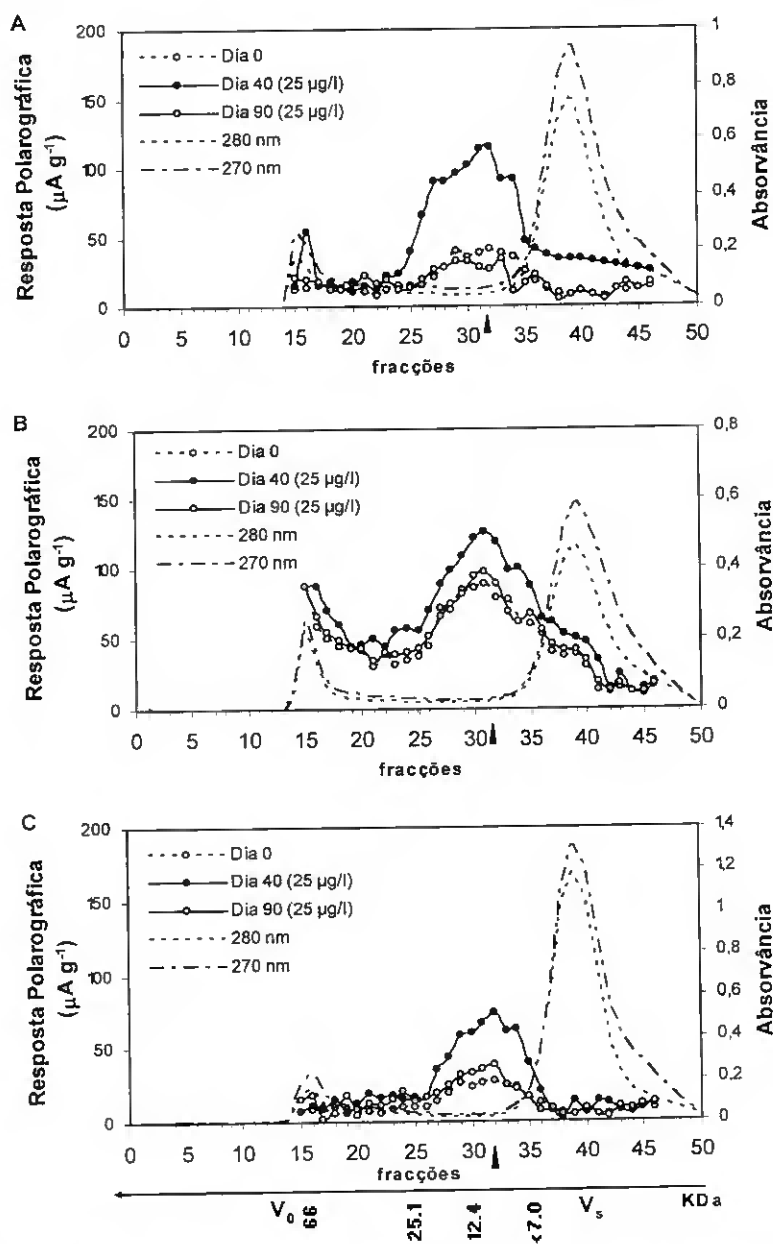


Figura 4.15 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fração FBPM das brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas não contaminadas e contaminadas com $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ao fim de 40 dias e depuradas durante 50 dias (▲ fração onde elui a MT).

A diminuição de grupos tiólicos no perfil cromatográfico da fração FBPM da glândula digestiva no final do período de depuração (Figura 4.15-B) foi de 89% nas frações 25-35. O decréscimo da resposta polarográfica no final do período de depuração, também foi acompanhado por uma diminuição da concentração de Cu, a qual decresceu 99% do total acumulado (Figuras 4.9-B e 4.15-B).

Os teores de MT na restante parte edível das amêijoas durante o período de eliminação (Figura 4.11-C) decresceram, tal como nas brânquias, exponencialmente ($MT = 437 e^{-0,007t}$; $r=0,785$; $p<0,05$), atingindo no último dia de depuração uma concentração de $336 \pm 31 \text{ nmol g}^{-1}$, correspondendo a um decréscimo de 82% dos teores de MT induzidos. O tempo de meia vida calculado para esta proteína na restante parte edível (16 dias) foi inferior comparativamente com os outros tecidos.

À semelhança dos tecidos anteriores, o decréscimo de 86% de grupos tiólicos no final do período de depuração pode ser observado no perfil cromatográfico da fração FBPM na restante parte edível (Figura 4.15-C).

De uma forma geral, durante o período de depuração de 50 dias, os compostos tiólicos induzidos durante a exposição ao Cu foram degradados nos três tecidos, apesar do Cu ter sido eliminado mais rapidamente.

4.3.4. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE Cu NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

Na Figura 4.16 encontram-se as relações existentes entre a concentração de MT e de Cu (total e na fracção FBPM), durante os períodos de acumulação e de eliminação, nos três tecidos analisados. As relações lineares encontradas foram significativas em todos os tecidos, quer no total quer na fracção FBPM ($p < 0,05$).

Os declives das equações são significativamente superiores na fracção FBPM comparativamente com o total, em todos os tecidos e durante os dois períodos ($p < 0,05$), sendo os coeficientes angulares significativamente superiores nas brânquias e na restante parte edível, comparativamente com a glândula digestiva ($p < 0,05$). Por outro lado, e contrariamente aos teores de Cd (Capítulo III – secção 3.3.3), os declives foram mais acentuados durante o período de eliminação comparativamente ao de acumulação, mostrando que a velocidade de degradação da MT à medida que os teores de Cu decrescem é superior à velocidade de indução desta proteína com o aumento da concentração de Cu.

A ligação de Cu à MT ao longo do tempo de exposição e de depuração em ambas concentrações de Cu, pode ser traduzida pela razão molar de MT:Cu na fracção subcelular FBPM dos diferentes tecidos de *R. decussatus* (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Razão molar MT:Cu na fracção FBPM em diferentes tecidos das amêijoas expostas durante 40 dias a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu e depuradas durante 50 dias e expostas durante 25 dias a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu.

Dias	Brânquias		Glândula digestiva		Resto	
	$25 \mu\text{g l}^{-1}$	$50 \mu\text{g l}^{-1}$	$25 \mu\text{g l}^{-1}$	$50 \mu\text{g l}^{-1}$	$25 \mu\text{g l}^{-1}$	$50 \mu\text{g l}^{-1}$
0	1:0,1	1:0,1	1:0,2	1:0,2	1:0,03	1:0,03
7	1:0,1	1:0,4	1:0,1	1:0,3	1:0,1	1:0,3
14	1:0,3	1:0,6	1:0,7	1:0,6	1:0,2	1:0,2
21	1:0,4	1:0,6	1:0,6	1:0,8	1:0,2	1:0,2
25 ou 30 ^(a)	1:0,6	1:0,8	1:0,6	1:0,8	1:0,2	1:0,4
40	1:0,4		1:1,6		1:0,3	
50	1:0,1		1:0,3		1:0,2	
60	1:0,01		1:0,1		1:0,1	
75	1:0,01		1:0,01		1:0,1	
90	1:0,1		1:0,1		1:0,05	

(a) 25 dias na exposição a $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ e 30 dias na exposição a $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$

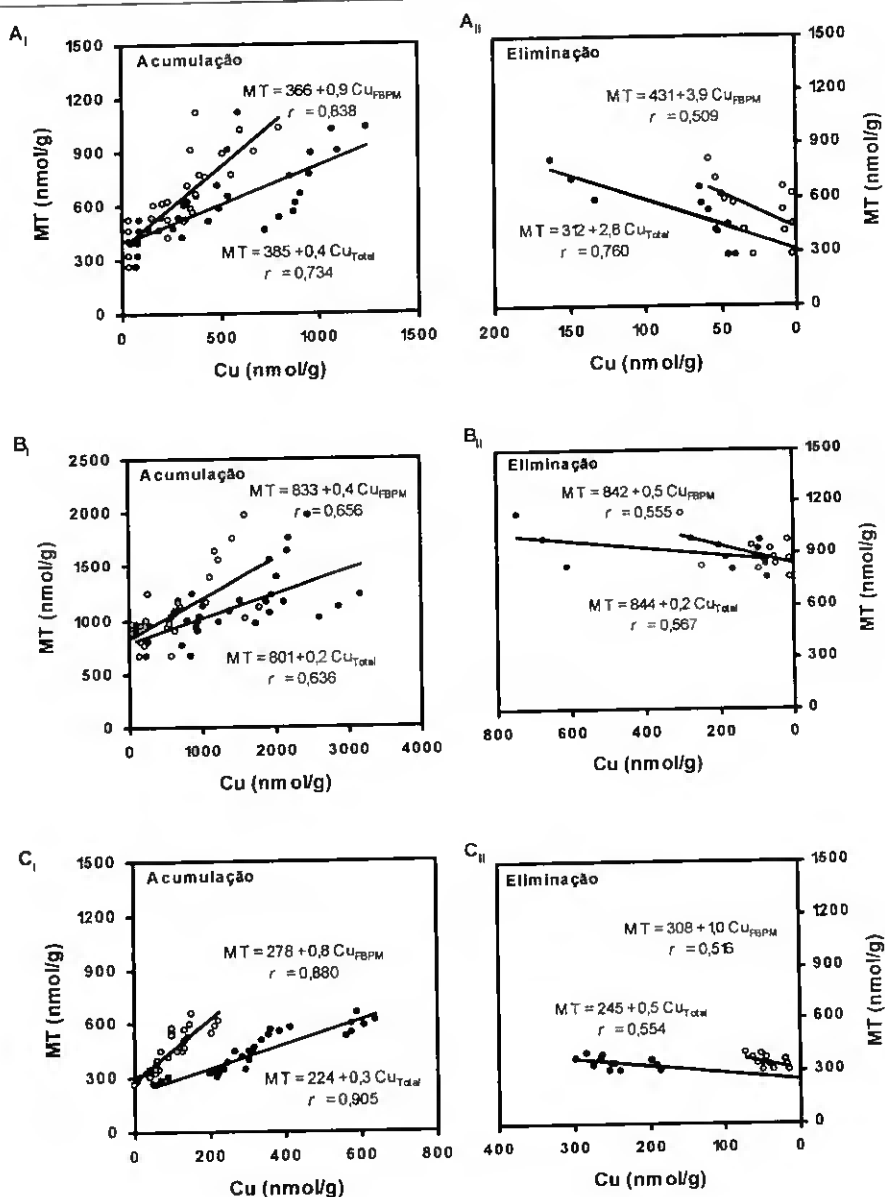


Figura 4.16 - Relação entre as concentrações de MT e Cu nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), durante os períodos de acumulação (I) e de eliminação (II). Total (●) e fração FBPM (○).

A razão molar MT:Cu mostrou que a MT nos tecidos das amêijoas não contaminadas e nas expostas a 25 e a 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$, não foi saturada pelo Cu. A razão de 1:12 característica das ligações desta proteína relativamente ao Cu (Capítulo I – secção 1.2.1.1) nunca não foi atingida (Tabela 4.8).

Durante o tempo de exposição a razão molar MT:Cu apresentou uma tendência decrescente, em todos os tecidos e em ambas as exposições ao Cu, mostrando que este elemento ligou-se à MT.

A razão molar MT:Cu foi mínima no 30º dia de exposição a 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ e no 25º dia na exposição a 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ nas brânquias e no último dia de exposição (40º dia e 25º dia) na glândula digestiva e na restante parte edível (Tabela 4.8), indicativo de um maior número de átomos ligados a esta proteína. Ao fim de 50 dias de depuração a razão molar MT:Cu aproximou-se da observada nas amêijoas não contaminadas, em todos os tecidos analisados (Tabela 4.8).

4.4. DISCUSSÃO

O Cu apesar de essencial aos moluscos, fazendo parte da estrutura de várias metaloenzimas (da Silva & Williams, 2001) e também encontrado na estrutura das MTs (Winge, 1991) é tóxico acima de concentrações não requeridas pelos organismos, como referido na introdução deste Capítulo. De facto, este elemento revelou-se bastante tóxico para a amêijoia *R. decussatus*, pois apesar do LC_{50} às 96 horas ser $715 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.3), a concentração utilizada no ensaio com $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ foi letal ao fim de 25 dias de exposição. Estes resultados provavelmente relacionam-se com a capacidade limitada desta espécie em responder a concentrações de Cu em excesso, apesar deste elemento ser essencial, e por isso os organismos desenvolverem mecanismos de armazenamento de forma a garantir a disponibilidade deste metal e ainda mecanismos de excreção de forma a prevenir o excesso da sua concentração (Blasco & Puppo, 1999).

A presença de MT relacionada com os teores de Cu já tinha sido demonstrada na amêijoia *R. decussatus*, quer em estudos de campo (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999; 2000; Serafim & Bebianno, 2001; Bebianno & Serafim, 2003) quer em estudos laboratoriais (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Gêret *et al.*, 2002). No entanto, nunca foram identificadas as variações da concentração de MT ao longo do tempo em amêijoas desta espécie expostas a uma concentração subletal de Cu e posteriormente depuradas, de forma a perceber a acção desta proteína nos processos de acumulação e de eliminação deste metal. Igualmente desconhece-se o papel destas proteínas em exposições agudas. Desta forma, e tal como no caso do Cd (Capítulo III), é necessário conhecer a cinética de acumulação e depuração e a distribuição subcelular deste elemento, para se poder concluir sobre a afinidade deste metal para os diferentes ligandos.

O trabalho experimental mostrou que o Cu foi acumulado em todos os tecidos e em ambas as exposições (25 e $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$). No entanto, na contaminação com $25 \mu\text{g l}^{-1}$ os teores deste elemento foram acumulados linearmente ao longo do tempo, mostrando que a excreção do Cu é mais lenta relativamente à sua assimilação. Este padrão de acumulação leva a um aumento contínuo de Cu durante o tempo de exposição, devido

provavelmente à não saturação dos ligandos por parte deste metal (Figura 4.4). Na contaminação com $50 \mu\text{g l}^{-1}$, apesar do Cu ter aumentado nos tecidos de *R. decussatus* ao longo do tempo de exposição, a acumulação de Cu seguiu o modelo cinético de 1ª ordem, o qual reflecte inicialmente uma assimilação rápida de Cu em relação à sua eliminação e à medida que o tempo decorre a taxa de assimilação de Cu decresce, atingindo um equilíbrio (Figura 4.8 e Tabela 4.5).

Apesar de todos os tecidos terem apresentado a mesma tendência de acumulação de Cu para cada uma das exposições, as taxas de assimilação e de eliminação variaram em cada um dos tecidos analisados. Na exposição a $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ a glândula digestiva correspondeu ao tecido que apresentou a maior taxa de acumulação ($63 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$), seguido pelas brânquias ($13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e por último a restante parte edível ($6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Na exposição a $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$, as taxas de assimilação ($K_a = 263 \text{ d}^{-1}$) e de eliminação ($K_d = 0,202 \text{ d}^{-1}$), são de uma forma geral superiores nas brânquias comparativamente com os outros tecidos, indicando que este tecido assimila e elimina mais rapidamente os teores de Cu podendo atingir mais rapidamente o equilíbrio (Figura 4.8 e Tabela 4.5). Por outro lado, verifica-se que o factor de bioconcentração é mais elevado na glândula digestiva ($\text{BCF} = 3576$), mostrando que apesar da taxa de assimilação ($K_a = 0,230 \text{ d}^{-1}$) não ser superior à observada nas brânquias, a taxa de depuração é muito inferior ($K_d = 0,064 \text{ d}^{-1}$), consequentemente o equilíbrio neste tecido é mais difícil de atingir, sendo necessário um maior tempo de exposição e uma concentração acumulada superior. A restante parte edível comparativamente com os outros tecidos, mostrou ser o tecido com taxas de assimilação (K_a) e de eliminação (K_d) e o factor de bioconcentração mais baixos. Sobral & Widdows (1997) também calcularam um factor de bioconcentração de 3840 nesta espécie de amêijoas utilizando o total dos tecidos em organismos expostos a $10 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 20 dias.

Os resultados da acumulação de Cu nos diferentes tecidos de *R. decussatus* são comparáveis com os obtidos para esta espécie e para este metal com outras concentrações, como por exemplo, $150 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 7 dias (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995) e $10 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 20 dias (Sobral & Widdows, 1997) e com outras espécies de bivalves, como os mexilhões *Perna Perna* expostos a $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 24 dias (Anandraj *et al.*, 2002) e *P. Viridis* exposto à mesma concentração durante 30

dias (Sze & Lee, 2000). Também no mexilhão de água doce *D. polymorpha* exposto a várias concentrações de Cu (4,5, 9, 21 e 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$) durante 27 dias, os teores de Cu foram acumulados linearmente ao longo do tempo (Mersch *et al.*, 1993). Estes resultados mostram que os níveis de Cu nos tecidos destes organismos dependem do tempo de exposição e da concentração presente no meio. No entanto, para concentrações mais baixas este elemento pode ser regulado, possivelmente através de mecanismos de homeostasia que incluem alterações na taxa de excreção (George, 1990; Giguère *et al.*, 2003).

A distribuição subcelular de Cu nas brânquias e na glândula digestiva mostrou que a maior quantidade deste elemento se encontra associado à fracção citosólica de baixo peso molecular (FBPM), enquanto que na restante parte edível a maior percentagem deste metal está na fracção insolúvel (FI). Nas amêijoas expostas a Cu, os teores deste metal aumentam linearmente nestas fracções ao longo do tempo de exposição, sem terem atingido o equilíbrio (em ambas as exposições). No entanto, no final do período de exposição a distribuição subcelular de Cu altera-se em todos os tecidos e em ambas as exposições (Tabela 4.3), verificando-se principalmente um aumento da percentagem deste metal na fracção FI nas duas exposições e na FEPM na exposição a 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$. A variação da distribuição de Cu nas diferentes fracções subcelulares pode reflectir alterações na actividade funcional ou estrutural da célula (Yang *et al.*, 2000). Estas alterações foram mais significativas nos tecidos das amêijoas expostas à concentração mais elevada, em que o aumento de Cu na fracção FEPM poderá estar associado a componentes da célula onde exerce toxicidade e possivelmente levando à morte dos organismos.

O aumento da concentração de Cu na fracção citosólica de baixo peso molecular (FBPM), sugere que esta fracção representa um papel fundamental na acumulação de Cu, provavelmente através da sua ligação às metalotioninas. Resultados semelhantes na distribuição subcelular de Cu foram obtidos nas brânquias e na glândula digestiva desta espécie exposta a 150 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 7 dias, confirmando que o Cu se encontra principalmente associado à fracção citosólica (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995).

Alguns autores defendem a ideia da existência de dois grupos de MTs interactivos, um responsável pelas necessidades de Cu e Zn na célula e o outro responsável pela ligação a metais tóxicos, tais como o Cd (Wang *et al.*, 1999). Neste trabalho, apesar de se verificar um aumento na resposta polarográfica, indicativo de um aumento de compostos tiólicos e consequentemente de MT, não foi possível através das técnicas utilizadas distinguir as diferentes isoformas da MT. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que o Cu se ligou a proteínas presentes na fracção citosólica dos diferentes tecidos de *R. decussatus*. Estas proteínas são características das MTs de uma grande variedade de moluscos. O peso molecular aparente encontrado nas fracções subcelulares onde eluiu a maior concentração de Cu por cromatografia de filtração em gel, assim como a resposta polarográfica encontrada nas mesmas fracções (10-14KDa), coincide com as MTs encontradas em organismos contaminados com Cd, quer nesta espécie de bivalve (Bebiano *et al.*, 2000; Simes *et al.*, 2003) quer em outros moluscos, utilizando a mesma técnica analítica (Duquesne *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 1995; Bordin *et al.*, 1997; Engel, 1999; Ponzano *et al.*, 2001).

A ligação de Cu à MT nesta espécie de amêijoia foi evidente nos três tecidos, apesar da glândula digestiva apresentar os níveis mais elevados desta proteína. Também nos mexilhões *M. edulis* e *M. galloprovincialis* a concentração de base de MT na glândula digestiva ($\approx 8 \text{ mg g}^{-1}$ peso seco por polarografia) é superior comparativamente com os outros tecidos o que parece reflectir o seu papel no metabolismo dos metais essenciais (Langston *et al.*, 1998).

O Cu associado à MT nos tecidos de *R. decussatus* aumentou proporcionalmente à concentração presente no meio e ao tempo de exposição (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7). No entanto, nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas, no final do período de exposição à concentração mais elevada ($50 \mu\text{g l}^{-1}$), apesar da concentração de Cu não ter decrescido, a concentração de MT diminuiu (Figuras 4.4 e 4.11). Este comportamento pode ser resultado, da excreção da MT e/ou catabolismo da MT nos lisossomas, processos estes que podem ser mais rápidos que a indução da síntese de MT (Nordberg, 1998). Um efeito semelhante foi detectado no rim da carpa *Cyprinus carpio* (De Boeck *et al.*, 2003) e no fígado de *Brachydanio rerio* (Paris-Palacios *et al.*, 2000), nos quais a quantidade de MT decresce ao fim de alguns dias de exposição

ao Cu. É possível que uma rápida acumulação de Cu, possa também causar inibição da síntese de MT, tal como apontado por Tóth *et al.* (1996).

A indução de MT nas brânquias da amêijoia *R. decussatus* exposta a Cu foi também referida por G  ret *et al.* (2002). Estes autores observaram um aumento desta proteína nas brânquias ao fim de três dias de exposi  o a 25 $\mu\text{g l}^{-1}$, no entanto o mesmo não sucedeu quando a concentra  o de Cu foi mais baixa (0,5 e 2,5 $\mu\text{g l}^{-1}$). Similarmente Rom  o & Gnassia-Barelli (1995) referem uma indu  o de MT nas brânquias, apesar de não terem observado indu  o desta proteína na glândula digestiva desta espécie exposta a 150 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 7 dias.

A indu  o de MT devido    exposi  o de Cu também foi detectada em vários tecidos (brânquias, glândula digestiva e manto) de outras espécies de moluscos, como por exemplo, o mexilhão *M. galloprovincialis* em que a estimula  o da síntese desta proteína ocorreu entre 2-5 dias de exposi  o a 15 e 80 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Viarengo *et al.*, 1981a) e a ostra *C. virginica* ao fim de 7 dias de exposi  o a 20 e 40 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Connors & Ringwood, 2000).

Nos mexilhões de água doce *A. grandis* (Couillard *et al.*, 1993) e *P. grandis* (Wang *et al.*, 1999) a indu  o da biosíntese da MT responde ao Cd, mas não ao Cu ou ao Zn. Também no mexilhão *D. polymorpha* exposto a 5 e 10 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ não se verificou qualquer altera  o nos níveis de MT e os organismos limitaram a sua bioacumula  o (Lecoeur *et al.*, 2004). No entanto, num estudo de campo no rio St Lawrence (Canada) nesta espécie, os níveis de Cu correlacionaram-se significativamente com os de MT (Lafontaine *et al.*, 2000).

A estima  o da razão MT:Cu (Tabela 4.9) mostra que a capacidade desta proteína se ligar ao Cu não foi excedida em ambas as exposi  es e em todos os tecidos. Esta razão também indicou que o Cu foi sequestrado pela quantidade de metalotionina já existente nos diferentes tecidos, uma vez que esta razão diminuiu    medida que o tempo de exposi  o aumentou. A liga  o de Cu a esta proteína também pode ser comprovado pelas correla  es positivas e significativas obtidas nos diferentes tecidos durante o período de acumula  o (Figura 4.16).

Durante o período de depuração, o Cu foi consideravelmente eliminado ($\approx 70\%$), especialmente nos primeiros dias de depuração (10 dias). O tempo de meia vida estimado para cada um dos tecidos das amêijoas pré-expostas a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ foi de 6, 5 e 12 dias para as brânquias, glândula digestiva e restante parte edível. O tempo de meia vida de Cu estimado nas diferentes frações subcelulares para cada um destes tecidos (Tabela 4.4) revelou que a fração subcelular FBPM desempenha uma importante função na eliminação de Cu nas brânquias e na glândula digestiva, apresentando tempos de meia vida mais baixos comparativamente com o das outras frações subcelulares (4 dias).

Resultados semelhantes foram obtidos por Gnassia-Barelli *et al.* (1995) nesta espécie exposta a 30 e a $150 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ e depuradas durante 8 dias, em que 50% do Cu foi eliminado ao fim de três dias de depuração. Também no mexilhão *P. perna* pré-exposto a $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 24 dias, 95% do total de Cu foi eliminado nos primeiros 8 dias de depuração (Anandraj *et al.*, 2002). Analogamente, na glândula digestiva do mexilhão *M. galloprovincialis* exposto durante 3 dias a $40 \mu\text{g Cu l}^{-1}$, os teores de Cu foram eliminados durante um período de depuração de 12 dias. Essa eliminação ocorreu em algumas frações subcelulares, nomeadamente na nuclear, mitocrôndrial, microsossomal e solúvel, tendo aumentado na fração lisossomal e na fração pós-lisossomal consistindo em corpos residuais, os quais correspondem provavelmente ao mecanismo de eliminação de Cu das células (Viarengo *et al.*, 1981b).

Simultaneamente com a eliminação do Cu foi observada uma rápida diminuição de MT nos tecidos da amêijoia *R. decussatus*, a qual foi confirmada pela relação positiva e significativa existente entre os teores desta proteína e a concentração de Cu na FBPM em todos os tecidos desta amêijoia, durante o período de depuração (Figura 4.16), sendo a taxa de degradação da MT em função da diminuição da concentração de Cu (durante o período de depuração) superior à taxa de indução desta proteína em função do aumento da concentração de Cu (durante o período de acumulação). Deste modo, e contrariamente ao observado no caso do Cd (Capítulo III), a indução de MT para se ligar aos íons Cu livres corresponde a um processo mais lento do que ao de libertação deste metal da MT durante o período de depuração,

A cinética de eliminação do Cu, a qual é mais rápida comparativamente com a do Cd (Capítulo III), talvez possa ser explicada pelo modo da degradação das MTs ligadas ao Cd ou ao Cu. A MT contendo Cu (Cu-MT) é transportada para vesículas e eliminada por exocitose (da Silva & Williams, 2001), talvez por isso o tempo de meia vida deste metal seja menor comparativamente com o dos outros metais. Similarmente, no mexilhão *M. edulis* foi detectada uma transferência do complexo Cu-MTs para os lisossomas em contraste com o que sucede com Cd-MTs, tendo sido estimado um tempo de meia vida de 10 – 12 dias para o Cu e de 4 meses para o Cd (Viarengo, 1985; 1989; Maroni, 1990).

De uma forma geral, podemos concluir que a fracção subcelular FBPM, na qual se encontra a MT, apresenta a capacidade de incorporar mais de 50% do total de Cu acumulado, nas brânquias e na glândula digestiva, mostrando que esta proteína desempenha um papel fundamental no armazenamento deste metal nestes dois tecidos. No entanto, os resultados obtidos neste capítulo mostram comportamentos distintos entre tecidos. A resposta da MT aos teores de Cu nas brânquias é mais notória, sendo o incremento dos níveis desta proteína, em função da concentração e do tempo de exposição, superiores relativamente aos outros tecidos. A glândula digestiva, apesar de apresentar os teores mais elevados de MT, a sua resposta não é tão evidente. Por último os teores de MT na restante parte edível apresentam um comportamento semelhante aos das brânquias, contudo com teores inferiores. Por outro lado, esta proteína em todos os tecidos, apresenta também uma função importante na eliminação do excesso de iões Cu.

Apesar da resposta da MT relativamente aos teores de Cu apresentarem comportamentos distintos nos tecidos, os perfis cromatográficos obtidos em todos os tecidos revelaram que o Cu na fracção FBPM eluiu nas mesmas fracções que a maior quantidade de compostos tiólicos (>50%), coincidente com as fracções de peso molecular semelhante ao da MT. Por este motivo a leitura directa por PDI poderá ser utilizada na determinação dos teores de MT, apesar dos resultados finais poderem estar sobrestimados (30-40%), principalmente na glândula digestiva onde uma percentagem considerável elui nas fracções de elevado peso molecular.

Capítulo V

ACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE ZINCO NOS TECIDOS DA AMÊIJOA *Ruditapes decussatus*: ENVOLVIMENTO DA METALOTIONINA

5.1. INTRODUÇÃO

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.3. RESULTADOS

5.4. DISCUSSÃO

5.1. INTRODUÇÃO

Entre os elementos de transição essenciais em funções de numerosas enzimas e proteínas, o zinco (Zn) é o mais frequente. Em microorganismos, plantas e animais, aproximadamente 300 enzimas foram identificadas como requerendo Zn para a sua função (Prasad, 1993). O Zn é essencial não só na actividade enzimática, mas também na síntese de ADN e proliferação celular (Vallée & Auld, 1990). Este elemento coordenado com resíduos de cisteína e histidina em certos peptídeos apresenta afinidade para um único segmento de ADN na região promotora do gene (ex. "Zn-finger"). A ligação das proteínas "Zn-fingers" na área promotora aumenta a transcrição do ADN e consequentemente a síntese de proteínas resultante da sequência do ARNm (Berg, 1990). O Zn também apresenta uma função antioxidante, interagindo com os grupos SH de diferentes macromoléculas e assim evitando a sua oxidação (Prasad, 1993). No entanto, e como referido na introdução (secção 1.1.2.3), apesar do seu carácter essencial o Zn pode tornar-se tóxico acima dos níveis requeridos pelos organismos.

Os invertebrados marinhos desenvolveram estratégias para sobreviverem na presença de níveis tóxicos de metais, a mais comum inclui a remoção dos metais da fracção solúvel da célula através de diferentes processos, tais como: excreção (Mason & Nott, 1980), regulação da sua concentração no interior dos tecidos, retenção no interior de grânulos mineralizados (George & Pirie, 1980; Mason & Nott, 1980; Nott & Nicolaidou, 1993) e ainda a ligação com metalotioninas (MTs) e/ou outras metaloproteínas (Viarengo, 1989).

A ligação do Zn à MT, tal como o Cu, prende-se com a função constitutiva destas proteínas, participando no controlo da disponibilidade intracelular de metais essenciais, para satisfazer os requisitos de componentes dependentes destes metais (metaloenzimas, pigmentos respiratórios, ácidos nucleicos e membranas). Desta forma, a MT é capaz de doar Zn a receptores moleculares apropriados (metaloenzimas e factores transcripcionais) e assim regular as actividades dependentes deste metal, mediante interacções moleculares específicas, as quais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento celular (Rocsijadi, 1994b; Brzóska

& Moniuszko-Jakonink, 2001). MT-Zn é particularmente eficiente em doar o Zn a apoproteínas de várias enzimas dependentes deste metal (ex. anidrase carbónica, fosfatase alcalina) e assim restituindo a sua actividade (Udom & Brady, 1980). O envolvimento da MT no metabolismo do Zn também se relaciona com as metaloenzimas envolvidas na transcrição dos ácidos nucleicos (componente catalítico de ADN – polimerase) (Slater *et al.*, 1971) e ainda participando na regulação de genes (devido à sua capacidade de retirar o Zn das proteínas “Zn-finger”) (Ohtake *et al.*, 1983; Mackay *et al.*, 1993).

O carácter essencial do Zn implica a existência nos organismos de mecanismos homeostáticos que regulam a sua absorção, distribuição, assimilação celular e excreção (Vallée & Falchuk, 1993). De facto, este metal essencial é parcialmente regulado pelos moluscos bivalves, sendo a concentração de Zn nos tecidos destes organismos independente da concentração e do tempo de exposição ao Zn (Phillips & Rainbow, 1993; Brown & Depledge, 1998). A regulação parcial da concentração de Zn foi observada em mexilhões (Phillips & Rainbow, 1993; Rainbow, 1995) particularmente no caso de *M. galloprovincialis* (Regoli & Orlando, 1994), *M. edulis* (Amiard *et al.*, 1987), *Perna viridis* (Phillips, 1985; Chan, 1988; Phillips & Rainbow, 1993; Chong & Wang, 2001) e *P. perna* (Anandraj *et al.*, 2002). Tal como em outros moluscos bivalves, os níveis de Zn nos tecidos de *R. decussatus* parecem ser regulados (Cortesão *et al.*, 1986; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Serafim & Bebianno, 2001; Bebianno & Serafim, 2003 - Capítulos II e VII).

No entanto, existem vários estudos que mostram que os níveis de metais essenciais também podem dar uma boa indicação dos níveis ambientais. O mexilhão *M. galloprovincialis*, evidenciou uma variação sazonal significativa da concentração de Zn, em diferentes tecidos de organismos recolhidos no mar Adriático (Serra *et al.*, 1999). Também no mexilhão de água doce *Diplodon chilensis* existe uma relação directa entre os níveis de Zn acumulados nos tecidos e os níveis deste metal presente no ambiente (Valdovinos *et al.*, 1998).

A utilização da MT como marcador de exposição ao Zn permanece controversa nesta espécie de amêijoia, por um lado alguns estudos de campo revelam que a MT reflecte as concentrações ambientais de Zn (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000) outros

mostram que os níveis de MT não estão relacionados com as concentrações ambientais de Zn (Serafim & Bebianno, 2001; Bebianno & Serafim, 2003 – Capítulos II e VII). Estes resultados reflectem possivelmente diferentes exposições ambientais.

Apesar dos estudos anteriormente realizados com esta espécie exposta a Zn não terem demonstrado um envolvimento directo da MT, sabe-se que esta proteína desempenha um papel fundamental na homeostasia do Zn. No entanto, a ligação deste metal à MT ainda não foi demonstrada na *R. decussatus*, desconhecendo-se a distribuição de Zn nos diferentes componentes da fracção proteica de baixo peso molecular, na qual se encontra esta proteína.

Desta forma neste capítulo estudou-se o papel da MT na acumulação e eliminação de Zn em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição a Zn com duas concentrações diferentes (100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$) durante 40 dias, seguido por um período de depuração de 50 dias. Os processos de acumulação e de eliminação de Zn, foram acompanhados pelo estudo da distribuição de Zn pelas diferentes fracções subcelulares e pelos diversos componentes da fracção proteica de baixo peso molecular, de forma a concluir sobre a afinidade deste elemento para os distintos compartimentos celulares.

Nos ensaios de acumulação foi utilizada uma concentração de Zn muito elevada e afastada das concentrações que podem ocorrer no meio natural (1000 $\mu\text{g l}^{-1}$), no entanto, esta exposição poderá evidenciar a resposta da MT em função da concentração deste metal.

Os processos de acumulação e de eliminação foram seguidos em condições controladas na tentativa de responder às seguintes questões:

- (i) Qual a cinética de acumulação de Zn nos diferentes tecidos de *R. decussatus* e de que forma pode ser influenciada por diferentes exposições? Como pode a indução de MT influenciar essa cinética?
- (ii) Qual a cinética de depuração deste metal nos diferentes tecidos após as duas exposições e o que acontece à MT induzida durante o processo de acumulação?

(iii) Será que os níveis de MT induzidos por Zn na amêijoia *R. decussatus*, podem ser determinados directamente por PDI (Polarografia Diferencial com Impulsos), sem ser necessário recorrer a técnicas cromatográficas para separar os componentes da fracção citosólica, tal como acontece para o Cd e para o Cu?

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

As amêijoas *R. decussatus* (30-35 mm) utilizadas nos ensaios laboratoriais foram recolhidas na Ria Formosa, num local afastado de fontes antrópicas. Durante o período de recolha as amêijoas não se encontravam em fase de maturação. Os organismos foram transportados para laboratório, onde foram depurados durante 7 dias.

Decorrido o período de aclimação, as amêijoas foram expostas a concentrações subletais de zinco, durante 40 dias. Para tal, lotes de 60 indivíduos foram colocados em 9 aquários, com um volume de 10 litros. Três aquários serviram de controlo experimental, três foram contaminados com 100 µg l⁻¹ de cloreto de zinco (ZnCl₂·H₂O, Merck) e os outros três com uma concentração de 1000 µg l⁻¹. Após este período os exemplares foram colocados em água sem qualquer tipo de contaminação durante mais 50 dias. Os parâmetros físico-químicos medidos durante as experiências mantiveram-se inalterados (Capítulo III – secção 3.2.1).

Retiraram-se aleatoriamente, sem reposição, amostras de seis indivíduos por aquário, após 0, 7, 14, 21, 30 e 40 dias (período de acumulação) e nos dias 50, 60, 75 e 90 (período de eliminação).

Os organismos foram dissecados em brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo (manto, pé e músculos adutores). Amostras compostas de seis tecidos foram submetidas ao tratamento referido no Capítulo II (Figura 2.2 - secção 2.2) e em cada uma das fracções isoladas (homogeneizado total e diferentes fracções subcelulares: FI, FEPM e FBPM) dos respectivos tecidos, foi determinada a concentração de Zn por EAA com chama ou câmara de grafite, após um pré-tratamento por via húmida (Capítulo III - secção 3.2.1). Os teores de metalotionina (MT) foram determinados na fracção citosólica tratada termicamente (FBPM), de acordo com o método descrito por Bebianno & Langston (1989).

Tal como nos ensaios efectuados com Cu (Capítulo IV), recorreu-se à cromatografia de filtração em gel (CFG) em algumas amostras da fracção subcelular tratada

termicamente (FBPM), encontrando-se a metodologia utilizada descrita no Capítulo IV (secção 4.2.1.3). Frações (2 ml) do eluato foram recolhidas em diferentes tubos e determinada: (i) a absorvância a 280 e 220 nm, (ii) os teores de Zn por EAA com câmara de grafite sem tratamento prévio e (iii) o conteúdo em compostos tiólicos (-SH) por polarografia diferencial com impulsos (PDI) (Figura 4.1 - Capítulo IV).

A validação dos resultados da concentração de Zn foi determinada utilizando-se materiais de referência, nomeadamente tecido de ostra (NBS) (National Institute of Standards & Technology) em que os valores certificados são $830 \pm 57 \mu\text{g g}^{-1}$ comparativamente com valores determinados no laboratório ($867 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$).

As concentrações de MT e de Zn estão expressas em nmol g^{-1} de peso seco do tecido inicialmente homogeneizado, tendo sido utilizado para a MT uma massa molecular de 7328 Da (Simes *et al.*, 2003).

5.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variabilidade das concentrações de Zn e de MT ao longo do tempo foi testada nos diferentes tecidos através da análise de variância (ANOVA) a três entradas, considerando como variáveis independentes o tempo, a concentração de Zn a que os organismos foram expostos e o tecido. Para discriminar as diferenças entre cada uma das variáveis foi utilizado o teste de Duncan ($\alpha 0,05$).

Foram também efectuadas análises de regressão, quer entre as concentrações de Zn e de MT com o tempo, quer entre as concentrações de MT e de Zn na água, para um nível de significância de 0,05.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. CONCENTRAÇÃO DE Zn NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

A concentração (média \pm σ) de Zn (nmol g^{-1}) total e nas diferentes frações subcelulares (FI, FEPM e FBPM) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Zn ao fim de 40 dias de exposição e de 50 dias de depuração (dia 90), encontra-se na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Concentração de Zn (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, ao fim de 40 dias de exposição e 50 de depuração.

	Controlo	100 µg l ⁻¹ Zn		1000 µg l ⁻¹ Zn	
		Acumulação (40º dia)	Eliminação (90º dia)	Acumulação (40º dia)	Eliminação (90º dia)
Brânquias					
Total	1714 ± 179	2913 ± 236	2058 ± 195	9956 ± 931	5046 ± 822
FI	1270 ± 165 (60)	1646 ± 163 (40)	1250 ± 133 (51)	6280 ± 621 (54)	4093 ± 745 (58)
FEPM	450 ± 87 (21)	1442 ± 130 (35)	918 ± 92 (37)	1879 ± 108 (16)	1066 ± 148 (15)
FBPM	401 ± 103 (19)	1024 ± 58 (25)	290 ± 30 (12)	3496 ± 203 (30)	1887 ± 171 (27)
Gl. digestiva					
Total	1836 ± 289	3755 ± 375	2425 ± 351	8136 ± 1824	4248 ± 497
FI	1266 ± 286 (46)	2770 ± 179 (37)	1139 ± 115 (39)	5423 ± 224 (51)	1772 ± 205 (40)
FEPM	783 ± 114 (28)	1924 ± 140 (32)	1021 ± 140 (35)	2415 ± 156 (23)	1320 ± 104 (30)
FBPM	727 ± 190 (26)	1861 ± 106 (31)	785 ± 97 (27)	2697 ± 544 (26)	1355 ± 248 (30)
Resto					
Total	935 ± 138	1230 ± 129	1494 ± 212	4150 ± 418	3007 ± 223
FI	592 ± 144 (47)	1129 ± 119 (51)	1063 ± 187 (69)	2661 ± 308 (48)	2020 ± 185 (67)
FEPM	452 ± 191 (35)	583 ± 48 (27)	345 ± 39 (22)	1261 ± 97 (23)	452 ± 112 (15)
FBPM	223 ± 43 (18)	481 ± 37 (22)	140 ± 14 (9)	1628 ± 113 (29)	565 ± 73 (19)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de Zn em cada uma das frações subcelulares.

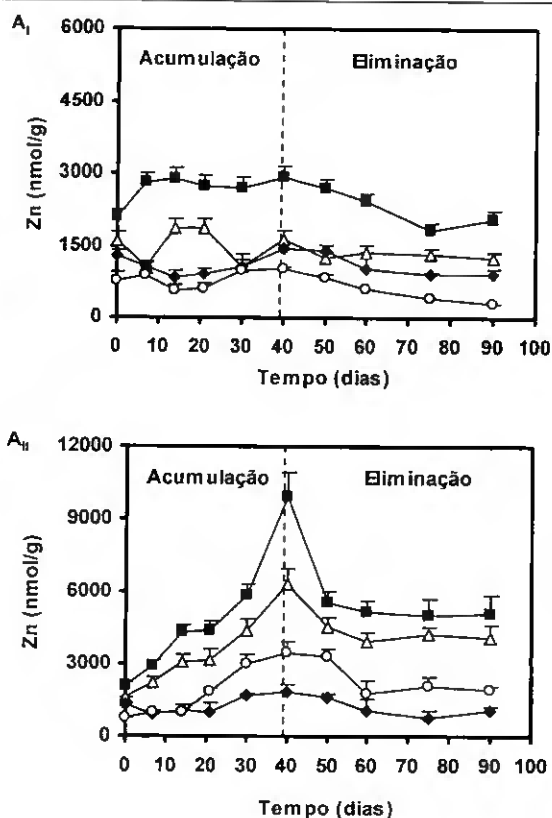
A concentração de Zn total nos diferentes tecidos das amêijoas não contaminadas, apesar de ter variado durante todo o ensaio laboratorial, principalmente na glândula digestiva, essa variação não foi significativa ($p > 0,05$). A concentração média de Zn na glândula digestiva e nas brânquias foram significativamente superiores à da restante parte edível ($p < 0,05$).

Os teores de Zn nas diferentes frações subcelulares destes tecidos, em contraste com os outros metais anteriormente analisados (Capítulo III e IV), foram mais elevados

na fracção FI comparativamente com as outras duas fracções (FEPM e FBPM), apresentando nesta fracção uma percentagem de Zn superior a 45% em todos os tecidos. As concentrações de Zn determinadas nos diferentes tecidos das amêijoas não contaminadas e expostas a Zn, encontram-se em anexo (Tabelas A.7, A.8 e A.9 em Anexo).

5.3.1.1. Acumulação de Zn

Na Figura 5.1 encontra-se a evolução da concentração Zn (total e nas diferentes fracções subcelulares) nas brânquias das amêijoas expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.



A concentração de Zn total nas brânquias das amêijoas expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, aumentou significativamente nos primeiros 7 dias de exposição ($p < 0,05$), atingindo uma concentração de $2809 \pm 199 \text{ nmol g}^{-1}$. Após este período, não foram observadas diferenças significativas na concentração deste metal até ao final do período de exposição ($2813 \pm 89 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p > 0,05$). Contrariamente à concentração de Zn total, os teores de Zn nas fracções subcelulares variaram durante todo o período de exposição, mostrando existir remobilização de Zn entre as diferentes fracções (Figura 5.1-A_I).

Nas brânquias das amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, a concentração total de Zn aumentou exponencialmente até ao final do período de exposição ($\text{Zn} = 2218 e^{0,036t}$, $r = 0,983$; $p < 0,05$), atingindo uma concentração cinco vezes superior à concentração de Zn nas amêijoas não contaminadas. O mesmo padrão de acumulação foi observado nas fracções subcelulares: FI ($\text{Zn} = 1715 e^{0,032t}$, $r = 0,987$; $p < 0,05$), FEPM ($\text{Zn} = 966 e^{0,014t}$, $r = 0,703$; $p < 0,05$) e FBPM ($\text{Zn} = 712 e^{0,042t}$, $r = 0,976$; $p < 0,05$), nas quais os teores de Zn aumentaram respectivamente, 4, 2 e 5 vezes comparativamente com a concentração inicial (Figura 5.1-A_{II}). No entanto e contrariamente aos outros dois metais (Cd e Cu – Capítulos III e IV), a maior quantidade de Zn encontra-se na fracção insolúvel.

Para comprovar se o Zn se liga à MT, apesar da maior quantidade de Zn se encontrar na fracção FI, foi efectuado o perfil cromatográfico da fracção FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas e contaminadas com a concentração de Zn mais elevada ($1000 \mu\text{g l}^{-1}$) ao fim de 7 e 40 dias de exposição (Figura 5.2).

A maior quantidade de Zn na fracção FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas (495 nmol g^{-1} equivalente a 59% do total de Zn) eluiu entre as fracções 29 a 35, centrada na fracção 32, a qual tem um peso molecular de 10,2 KDa, correspondente ao peso molecular da MT (Tabela 4.1 do Capítulo IV – secção 4.2.1.3), confirmando que mesmo nas brânquias das amêijoas não contaminadas existe Zn ligado à MT, evidenciando a função constitutiva esta proteína neste tecido. Ao fim de 7 dias de exposição, o Zn nestas fracções aumentou cerca de 1,7 vezes (838 nmol g^{-1}), apresentando uma percentagem de Zn mais elevada (72%). No final do período de exposição (dia 40), a concentração de Zn nas fracções 29 a 35 continuou a aumentar

(1875 nmol g⁻¹ correspondendo a um aumento de 4 vezes relativamente ao das amêijoas não contaminadas) e contendo uma percentagem de 79% do total do Zn eluído (Figura 5.2). Estes resultados mostram que, quando as amêijoas são contaminadas com Zn existe uma percentagem significativa de Zn que se liga à MT, no citosol das brânquias.

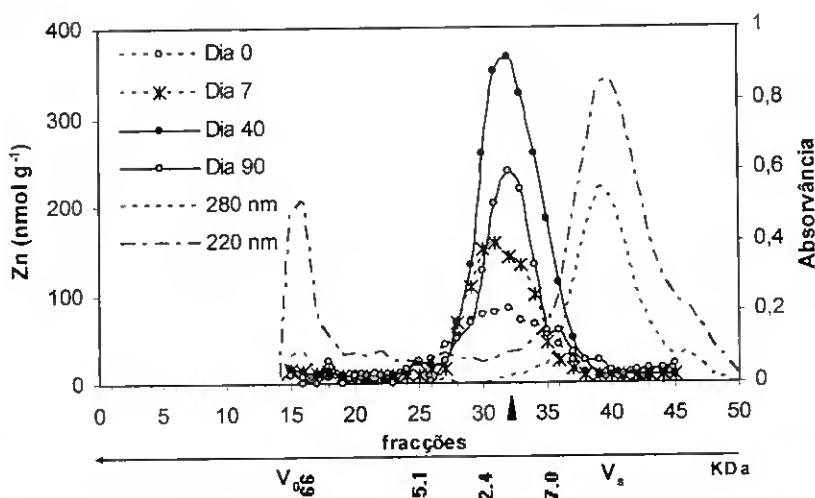
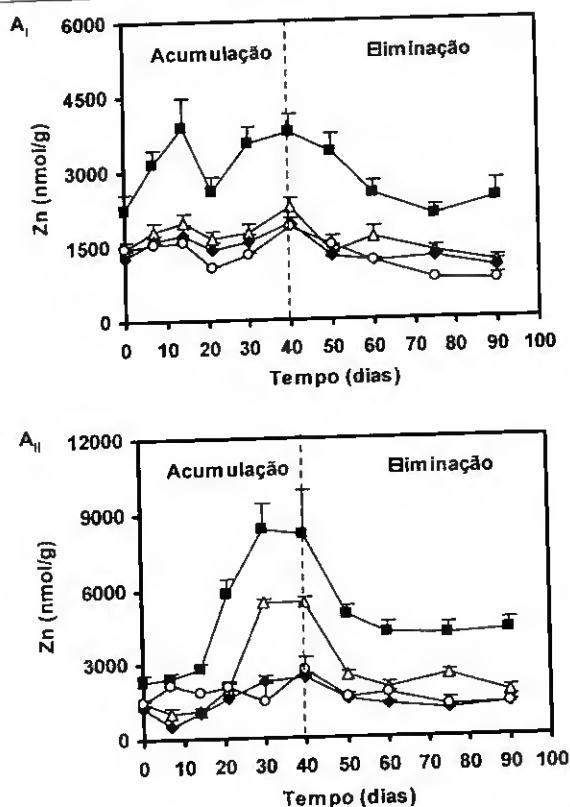


Figura 5.2 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Zn na fração FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas e das expostas a 1000 µg l⁻¹ ao fim de 7 e 40 dias e depuradas durante 50 dias. (▲ fração onde eluiu a MT).

Os teores de Zn na glândula digestiva, durante o período de exposição, apresentaram um comportamento distinto do observado nas brânquias (Figuras 5.1 e 5.3). Na glândula digestiva das amêijoas expostas a 100 µg l⁻¹, a concentração de Zn total aumentou linearmente até ao 14º dia, com uma velocidade de acumulação de 116 nmol g⁻¹ d⁻¹ ($r=0,998$; $p<0,05$). Posteriormente, decresceu significativamente até ao 21º dia e continuou a aumentar linearmente mas com uma velocidade de cerca de metade (59 nmol g⁻¹ d⁻¹, $r=0,998$; $p<0,05$) da observada no período inicial (Figura 5.3-A_D). A mesma tendência de variação foi encontrada nas diferentes fracções subcelulares (Figura 5.3-A_D).



A glândula digestiva das amêijoas expostas a 1000 µg l⁻¹ (Figura 5.3-A_{II}), acumulou Zn exponencialmente até ao 30º dia de ensaio ($Zn=1817 e^{0,05t}$, $r=0,932$; $p<0,05$) e após este período não houve variações significativas (8253 ± 167 nmol g⁻¹) ($p>0,05$). O mesmo comportamento foi observado na fração FI ($Zn=1375 e^{0,04t}$, $r=0,696$; $p<0,05$), que representa a fração com teores de Zn mais elevados, enquanto que, nas frações FEPM e FBPM os teores deste metal oscilaram durante todo o período de exposição. Devido ao aumento pouco significativo da concentração de Zn na fração subcelular FBPM, no final do período de exposição, não se utilizou a cromatografia para estudar a distribuição de Zn.

Na restante parte edível das amêijoas expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ (Figura 5.4-A_I), tal como nas brânquias, a concentração de Zn aumentou significativamente nos primeiros 7 dias de exposição e posteriormente não foram observadas diferenças significativas ($1196 \pm 50 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$). Os teores de Zn nas frações FI e FEPM acompanharam a mesma evolução que no total do tecido, enquanto que na fração FBPM a concentração aumentou exponencialmente durante o período de exposição ($\text{Zn-97 e }^{0,03\%}$, $r = 0,838$; $p < 0,05$).

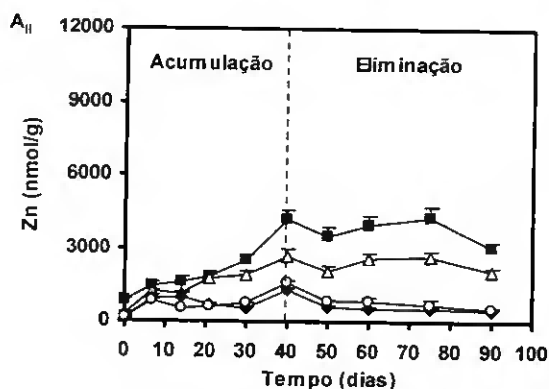
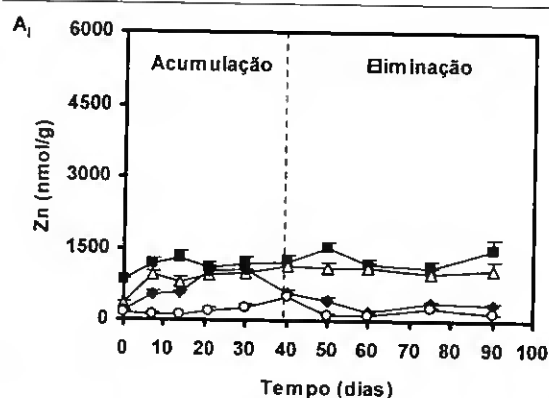


Figura 5.4 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) na restante parte edível das amêijoas expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (A_I) e a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ (A_{II}), durante 40 dias e depuradas durante 50 dias. (■ Total; Δ FI; \diamond FEPM; \circ FBPM).

No mesmo tecido das amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, a concentração de Zn aumentou, tal como nas brânquias, exponencialmente durante todo o período de exposição ($\text{Zn-947 e }^{0,04\%}$, $r = 0,975$; $p < 0,05$). O mesmo padrão foi observado nas frações FI

(Zn-605 e^{0,04t}, $r=0,964$; $p<0,05$) e FBPM (Zn-249 e^{0,04t}, $r=0,899$; $p<0,05$), enquanto que, na fração FEPM apenas aumentou significativamente nos primeiros 14 dias de exposição ($p<0,05$) (Figura 5.4-A_{II}).

Tal como no caso das brânquias comprovou-se a ligação de Zn à MT na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas ao fim de 40 dias de exposição a 1000 µg l⁻¹, utilizando a cromatografia em gel (Figura 5.5). O perfil de eluição cromatográfico mostrou que na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas não contaminadas, a maior quantidade de Zn eluiu nas mesmas frações que nas brânquias (29 a 35), centrada na fração 31 e com um peso molecular de 11,5 KDa, correspondendo a uma concentração de Zn de 156 nmol g⁻¹ (58% do total de Zn eluido), comprovando também neste tecido das amêijoas não contaminadas a presença de Zn ligado à MT. No final do período de exposição (dia 40), a quantidade de Zn nestas frações aumentou cerca de 4 vezes (663 nmol g⁻¹ correspondendo a 83% do total de Zn), centrando-se o máximo da concentração de Zn na fração 32 (10,2 KDa) (Figura 5.5).

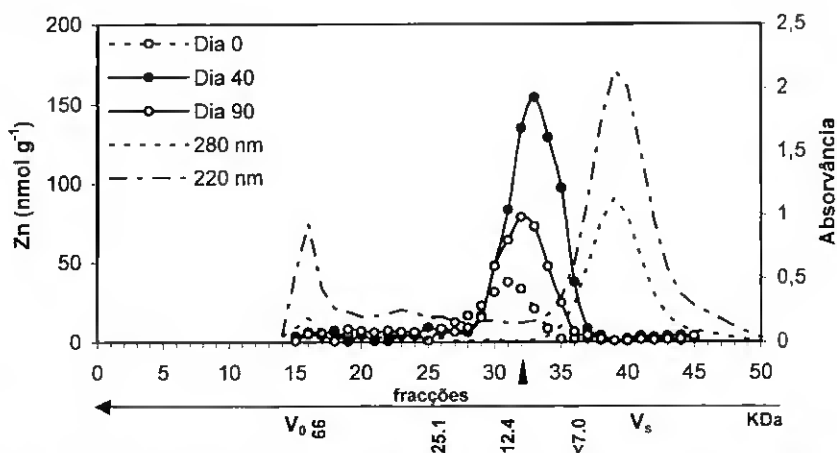


Figura 5.5 - Perfis de eluição cromatográficos da concentração Zn na fração FBPM da restante parte edível das amêijoas não contaminadas e das expostas a 1000 µg l⁻¹ ao fim 40 dias e depuradas durante 50 dias. (▲ fração onde eluiu a MT).

De uma forma geral, estes resultados mostraram que na exposição a 100 µg l⁻¹ de Zn, os três tecidos de *R. decussatus* acumularam este metal nos primeiros dias de

exposição, conseguindo posteriormente regular os níveis da concentração de Zn acumulados. No entanto, apesar da concentração de Zn nos três tecidos (total e frações subcelulares) ao fim de 40 dias de exposição, ter sido significativamente superior aos das amêijoas não contaminadas ($p < 0,05$), a distribuição subcelular de Zn não sofreu alterações relativamente ao controlo (FI > FEPM > FBPM) (Tabela 5.1). Por outro lado, nas amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, todos os tecidos acumularam exponencialmente os teores de Zn. A concentração deste elemento nos três tecidos (total e nas frações subcelulares), no final do período de exposição foi significativamente superior aos das amêijoas não contaminadas e das expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ($p < 0,05$), observando-se alteração da distribuição subcelular, em que, a percentagem de Zn na fração subcelular FBPM foi mais elevada do que na FEPM (FI > FBPM > FEPM). O aumento da quantidade de Zn na fração FBPM foi mais importante nas brânquias e na restante parte edível, verificando-se que o aumento da concentração deste metal nessa fração está associado a proteínas com peso molecular semelhante ao das MTs (Figuras 5.2 e 5.5).

5.3.1.2. Eliminação de Zn

Durante o período de depuração (40 – 90^o dia), a concentração de Zn nas brânquias das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ diminuiu linearmente nos primeiros 35 dias, com uma velocidade de eliminação de $31 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,991$; $p < 0,05$). A partir desse dia a concentração de Zn não se alterou ($1943 \pm 163 \text{ nmol g}^{-1}$), tendo no final do período de depuração este tecido conseguido eliminar todo o Zn acumulado (Figura 5.1-A₁). O tempo de meia vida de Zn calculado neste tecido foi de 15 dias. Por outro lado, a concentração deste metal na fração FI não variou significativamente durante o período de depuração ($1371 \pm 167 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$). Enquanto que, nas frações FEPM e FBPM os teores deste elemento decresceram exponencialmente ($\text{Zn} = 1414 e^{-0,010t}$, $r = 0,918$; $p < 0,05$ e $\text{Zn} = 1047 e^{-0,026t}$, $r = 0,999$; $p < 0,05$). No final do período de depuração, estas frações eliminaram todo o Zn acumulado (Figura 5.1-A₁), tendo sido estimado um tempo de meia vida deste metal de 4 e de 6 dias, na fração FEPM e FBPM, respectivamente.

Durante o mesmo período, a concentração de Zn total nas brânquias das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 5.1-A_{II}), diminuiu exponencialmente ($\text{Zn} = 7561 e^{-0,011t}$, $r = 0,724$; $p < 0,05$). Este tecido conseguiu eliminar 63% do Zn total acumulado e foi estimado um tempo de meia vida de Zn de 21 dias. Nas fracções subcelulares os teores deste metal, também decresceram exponencialmente durante o período de depuração: FI ($\text{Zn} = 5284 e^{-0,007t}$, $r = 0,703$; $p < 0,05$), FEPM ($\text{Zn} = 1689 e^{-0,014t}$, $r = 0,779$; $p < 0,05$) e FBPM ($\text{Zn} = 3248 e^{-0,013t}$, $r = 0,797$; $p < 0,05$) (Figura 5.1-A_{II}). As fracções FI e FBPM conseguiram eliminar 47 e 59% do Zn acumulado, enquanto que a FEPM eliminou todo o Zn acumulado. O tempo de meia vida de Zn calculado em cada uma destas fracções foi de 44 dias na fracção FI, 5 dias na FEPM e de 33 dias na FBPM.

A eliminação de Zn na fracção FBPM das brânquias das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, foi comprovada através do perfil cromatográfico da concentração deste metal (Figura 5.2). A quantidade de Zn existente ao fim de 50 dias de depuração, encontrada entre as fracções 29 a 35 (1044 nmol g^{-1} , correspondendo a uma percentagem 71% do total do Zn eluído), diminuiu aproximadamente 60% relativamente ao Zn acumulado no final do período de exposição (40º dia), sendo no final do período de depuração ainda cerca de 2 vezes superior ao das brânquias das amêijoas não contaminadas (Figura 5.2).

A semelhança das brânquias, a glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 5.3-A_I), eliminou os teores de Zn até ao 35º dia de depuração, com uma velocidade de $50,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,979$; $p < 0,05$). Este tecido eliminou 88% do total de Zn acumulado, tendo sido calculado um tempo de meia vida deste metal de 15 dias. Os teores de Zn nas fracções subcelulares FI e FBPM também diminuíram linearmente, com velocidades de eliminação de $17,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,979$) e de $22,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,954$), respectivamente. Enquanto que na fracção FEPM os teores deste metal decresceram exponencialmente ($\text{Zn} = 1633 e^{-0,010t}$, $r = 0,838$; $p < 0,05$). No final deste período, a concentração de Zn acumulada nestas fracções foi totalmente eliminada. O tempo de meia vida de Zn calculado foi de 5, 3 e 2 dias, nas fracções FI, FBPM e FEPM, respectivamente.

A glândula digestiva das amêijoas pré-expostas $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 5.3-A_{II}), apresentou um padrão de eliminação distinto ao das pré-expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$. A concentração de Zn total decresceu exponencialmente ($\text{Zn} = 6368 e^{-0,011t}$, $r=0,757$; $p<0,05$), tendo sido eliminado 66% do total de Zn acumulado. O tempo de meia vida deste metal foi estimado em 19 dias. Tal como no total, os teores de Zn nas fracções subcelulares também decresceram exponencialmente: FI ($\text{Zn} = 3796 e^{-0,017t}$, $r=0,750$; $p<0,05$), FEPM ($\text{Zn} = 1929 e^{-0,011t}$, $r=0,766$; $p<0,05$) e FBPM ($\text{Zn} = 2235 e^{-0,013t}$, $r=0,842$; $p<0,05$), tendo estas fracções eliminado mais de 90% do Zn acumulado (Figura 5.3-A_{II}). O tempo de meia vida de Zn estimado em cada uma destas fracções foi de 6, 4 e 6 dias, respectivamente, sendo da mesma ordem de grandeza que os valores estimados para as brânquias para as fracções FEPM e FBPM.

Contrariamente ao observado nos outros tecidos, a concentração de Zn (total e fracções subcelulares) na restante parte edível das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 5.4-A_I), não variou significativamente ($p<0,05$), pelo que não foi possível determinar o tempo de meia vida de Zn neste tecido. Por outro lado, no mesmo tecido das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ apenas parte dos teores de Zn foram eliminados, embora a eliminação só se tenha iniciado a partir do 35º dia de depuração, tendo sido eliminado apenas 35% do Zn acumulado. Este comportamento foi semelhante na fracção subcelular FI, tendo também sido eliminado apenas 27% do Zn total acumulado. Nas fracções subcelulares FEPM e FBPM os teores decresceram exponencialmente ($\text{Zn} = 909 e^{-0,016t}$, $r=0,791$; $p<0,05$ e $\text{Zn} = 1279 e^{-0,018t}$, $r=0,889$; $p<0,05$), sendo eliminado mais de 70% do Zn acumulado. O tempo de meia vida deste elemento nestas fracções foi de 15 e 20 dias, respectivamente (Figura 5.4-A_{II}).

Para estudar o envolvimento da MT na ligação com o Zn durante o processo da eliminação, fez-se também uma cromatografia em gel da fracção FBPM da restante parte edível das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ no final do período de depuração (90º dia) (Figura 5.5). Tal como no final do período de acumulação (40º dia), a maior quantidade de Zn ao fim de 50 dias de depuração foi encontrada entre as fracções 29 a 35 (351 nmol g^{-1} , correspondendo a uma percentagem 77% do total do Zn eluído). A concentração de Zn nessas fracções diminuiu cerca de 62% relativamente ao Zn acumulado no final do período de exposição, sendo no final do período de depuração

ainda cerca de 2 vezes superior ao das amêijoas não contaminadas, o que revela que o Zn nesta fracção não foi todo eliminado (Figura 5.5).

Durante o período de depuração, de uma forma geral, os tecidos conseguiram eliminar todo o Zn acumulado nas amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, à excepção da restante parte edível. Por outro lado, nos tecidos das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ só parte dos teores deste metal foram eliminados e essa eliminação foi mais significativa na glândula digestiva, seguida das brânquias e da restante parte edível.

Ao fim de 50 dias de depuração, tal como observado no final do período de exposição, a distribuição subcelular de Zn nos tecidos das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, foi semelhante ao das amêijoas não contaminadas. Enquanto que, a distribuição subcelular de Zn nos tecidos das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ foi semelhante à observada no final do período de exposição e distinta das amêijoas não contaminadas, observando-se uma percentagem mais elevada de Zn na FBPM relativamente à fracção FEPM (FB>FBPM>FEPM) (Tabela 5.1), o que confirma o envolvimento da MT no processo de eliminação do Zn acumulado.

5.3.2. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

A concentração de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Zn durante 40 dias seguidos de 50 dias de depuração, encontra-se na Figura 5.6. Os valores da concentração de MT obtidos durante os ensaios laboratoriais encontram-se em anexo (Tabela A.13 em Anexo).

A concentração de MT (média $\pm \sigma$) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas (Figura 5.8) não variou significativamente durante o ensaio experimental (345 ± 63 , 725 ± 84 e 280 ± 41 nmol g^{-1} , respectivamente), apresentando a glândula digestiva teores desta proteína significativamente superiores (cerca de 2 vezes) aos das brânquias e restante parte edível ($p < 0,05$).

5.3.2.1. Indução de MT

Contrariamente às brânquias das amêijoas não contaminadas, os teores de MT nas brânquias das amêijoas expostas a 100 e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Zn (Figura 5.6-A) aumentaram linearmente durante os primeiros 21 dias de exposição, com uma velocidade de 12,1 nmol $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r = 0,971$; $p < 0,05$) e de 25,2 nmol $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($r = 0,983$; $p < 0,05$), respectivamente. No entanto, no último dia de exposição, não foram observadas diferenças significativas entre os teores de MT nas brânquias das amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ e das não contaminadas ($p < 0,05$), enquanto que os teores de MT nas brânquias das amêijoas expostas a 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ aumentaram significativamente (cerca de 2,5) relativamente aos teores nas brânquias das amêijoas não contaminadas ($p < 0,05$), atingindo no último dia de exposição concentrações de 480 ± 80 nmol g^{-1} e de 837 ± 97 nmol g^{-1} nas brânquias expostas a 100 e a 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$, respectivamente.

Para comprovar a indução de MT nas brânquias das amêijoas expostas a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ foi utilizada a cromatografia em gel na fracção FBPM, e determinada a resposta polarográfica, em cada uma das fracções do perfil de eluição obtido, no início da exposição e após 7 e 40 dias (Figura 5.7).

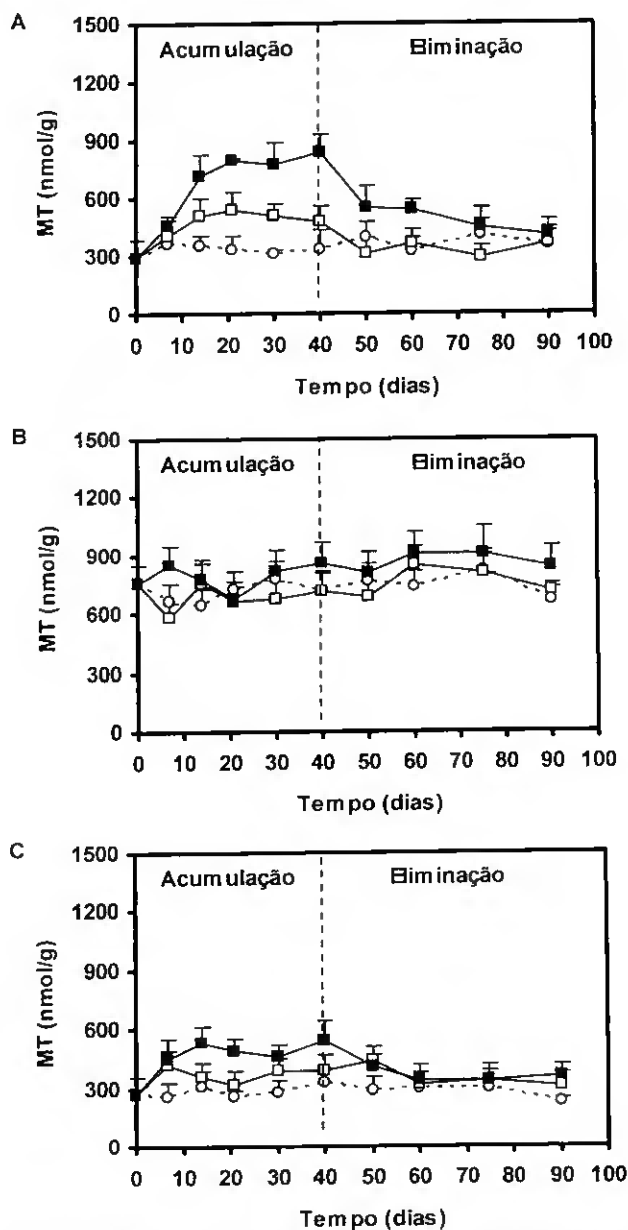


Figura 5.6 - Concentração (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), das amêijoas não contaminadas e expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ e a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias. (○ controle; □ 100 $\mu\text{g l}^{-1}$; ■ 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$).

O perfil cromatográfico da fracção FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas mostrou que, a maior quantidade de grupos -SH (- 55% do total de grupos tiólicos eluídos) se situa entre as fracções 27-37, nas quais se encontra a MT. Os restantes grupos de -SH distribuíram-se principalmente pelas fracções de elevado peso molecular (30%) e menor quantidade pelas fracções de baixo peso molecular (15%). Nas brânquias das amêijoas contaminadas ($1000 \mu\text{g l}^{-1}$) a resposta polarográfica aumentou, sendo máxima no dia 40 (cerca de 2,5 vezes) e centrada na fracção 32, tal como a concentração de Zn nesse dia (Figura 5.2 e 5.7), sugerindo a indução desta proteína e a ligação a Zn.

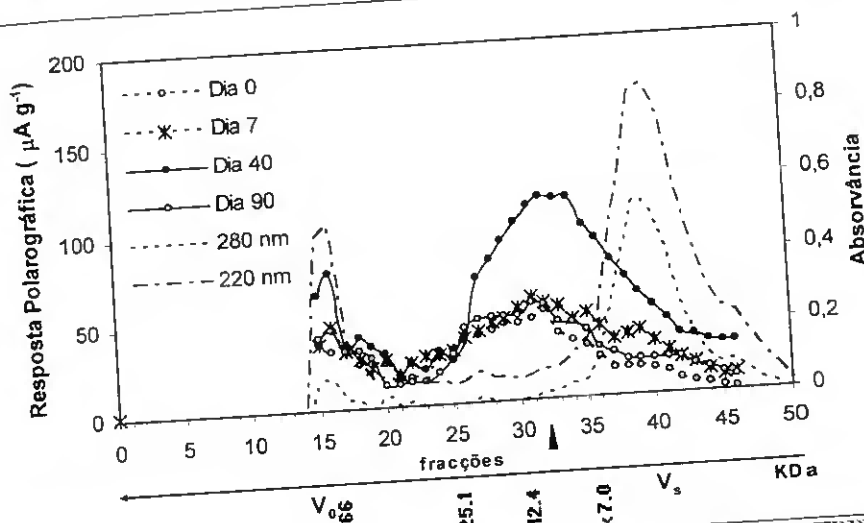


Figura 5.7 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fracção FBPM das brânquias das amêijoas não contaminadas e das expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ao fim de 7 e 40 dias e depuradas durante 50 dias (▲ fracção onde eluiu a MT).

A glândula digestiva por seu lado, apresentou um comportamento distinto do das brânquias (Figura 5.6-B). A concentração de MT, nas amêijoas expostas a 100 e a $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, mostrou grande variabilidade durante todo o período de exposição, mas ao fim de 40 dias de exposição, a concentração de MT nas amêijoas contaminadas não foi significativamente diferente das não contaminadas ($p > 0,05$).

Na restante parte edível das amêijoas expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$, a concentração de MT não variou significativamente durante o período de exposição ($356 \pm 55 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p > 0,05$).

(Figura 5.6-C), mas nas expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ os teores de MT aumentaram linearmente durante os primeiros 14 dias, com uma velocidade de indução de $19 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,980$; $p<0,05$). Após este período, os teores de MT não voltaram a variar ($507 \pm 58 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p<0,05$) (Figura 5.6-C). Ao fim de 40 dias de exposição, tal como nas brânquias, os teores de MT na restante parte edível das amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ foram significativamente superiores aos das amêijoas não contaminadas e das expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (cerca do dobro) ($p<0,05$).

À semelhança das brânquias, e uma vez que, os níveis de MT aumentaram significativamente na restante parte edível foi efectuado o perfil de eluição cromatográfico dos compostos tiólicos na fracção FBPM das amêijoas não contaminadas e expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ao fim de 40 dias (Figura 5.8). O perfil mostrou nas amêijoas não contaminadas, que a maior quantidade de grupos -SH (59 %) eluiu entre as fracções 25 e 35, centrada na fracção 28, a qual corresponde a um peso molecular de 16,4 KDa (Figura 5.8). Nas contaminadas a quantidade de grupos -SH aumentou, com uma resposta máxima na fracção 33, correspondendo também ao valor máximo de concentração de Zn (Figura 5.5 e 5.8). Este aumento da resposta polarográfica foi, no entanto, inferior ao observado nas brânquias, tal como para o caso da concentração de MT determinada por PDI (Figura 5.6).

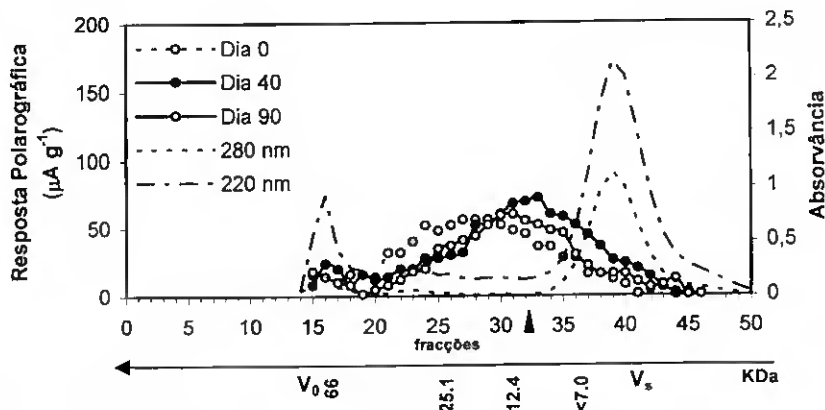


Figura 5.8 - Perfis de eluição cromatográficos dos compostos tiólicos na fracção FBPM da restante parte edível das amêijoas: não contaminadas, contaminadas com $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ ao fim de 40 dias e depuradas durante 50 dias (▲ fracção onde eluiu a MT).

5.3.2.2. Eliminação

Durante o período de depuração, a concentração de MT nas brânquias das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ decresceu significativamente nos primeiros 10 dias, no entanto, não foram observadas diferenças significativas relativamente às amêijoas não contaminadas ($p > 0,05$) (Figura 5.6-A). Nas brânquias das amêijoas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, a concentração de MT decresceu exponencialmente ($MT = 726 e^{-0,013 t}$; $r = 0,924$; $p > 0,05$), tendo no final do período de depuração decrescido 89% dos teores induzidos, apresentando esta proteína um tempo de meia vida de 19 dias (Figura 5.6-A). A diminuição dos teores de MT foi confirmada pelo perfil de eluição cromatográfico da fracção FBPM, em que existe um decréscimo de 88% de grupos tiólicos no final do período de depuração (dia 90), entre as fracções 27-37 (Figura 5.7). Esta diminuição também foi acompanhada pela diminuição da concentração de Zn (Figura 5.2).

Os teores de MT na glândula digestiva das amêijoas pré-expostas ao Zn não variaram significativamente durante o período de depuração (753 ± 99 e $861 \pm 116 \text{ nmol g}^{-1}$, para as amêijoas pré-expostas a 100 e a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente) ($p > 0,05$) (Figura 5.6-B).

Na restante parte edível das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$, os teores de MT também não variaram significativamente durante o período de depuração ($368 \pm 78 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p > 0,05$), enquanto que nas amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, os teores desta proteína decresceram exponencialmente ($MT = 463 e^{-0,008 t}$; $r = 0,761$; $p > 0,05$), tendo decrescido 72% do total dos teores induzidos no último dia de depuração (Figura 5.6-C). À semelhança das brânquias, a diminuição de MT foi comprovada pelo perfil cromatográfico, que mostra um decréscimo de 68% dos grupos -SH na fracção FBPM da restante parte edível, nas fracções 27-37 no dia 90 (Figura 5.8). Este decréscimo de MT e consequentemente dos grupos tiólicos foi acompanhado por uma diminuição da concentração de Zn (Figura 5.5 e 5.8), tal como observado nas brânquias.

O tempo de meia vida da MT calculado na restante parte edível (18 dias) foi semelhante ao determinado nas brânquias (19 dias).

5.3.3. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE Zn NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

Na Figura 5.9 encontram-se as relações existentes entre a concentração de MT e de Zn (total e na fração FBPM), em cada um dos tecidos analisados durante os períodos de exposição e de depuração. As relações lineares encontradas foram significativas em todos os tecidos (total e fração FBPM) e em ambos os períodos ($p < 0,05$), mostrando que os teores de MT aumentam com o aumento de Zn durante o período de exposição, e diminuem com o decréscimo dos teores deste metal durante o período de depuração. No entanto, e tal como observado com as concentrações de Cd (Capítulo III - secção 3.3.3) e Cu (Capítulo IV - secção 4.3.4), na fração FBPM a taxa de aumento entre a concentração de MT e de Zn é significativamente superior comparativamente com o total, em todos os tecidos analisados ($p < 0,05$).

Por outro lado, as brânquias foram o tecido que apresentaram a maior taxa de incremento entre a concentração de MT e de Zn (Figura 5.9), apesar de não existirem diferenças significativas nos declives das equações entre os tecidos analisados ($p < 0,05$).

Contrariamente às concentrações de Cd (Capítulo III - secção 3.3.3) e Cu (Capítulo IV - secção 4.3.4), os coeficientes angulares em todos os tecidos durante o período de acumulação não foram significativamente diferentes dos encontrados durante o período de depuração, mostrando que a taxa de indução de MT com o aumento dos níveis de Zn é semelhante à taxa de degradação desta proteína durante o período de eliminação (Figura 5.9).

A ligação do Zn à MT também pode ser mostrada através da comparação da razão molar MT:Zn ao longo do período de exposição e de depuração na fração subcelular FBPM dos diferentes tecidos de *R. decussatus* (Tabela 5.2).

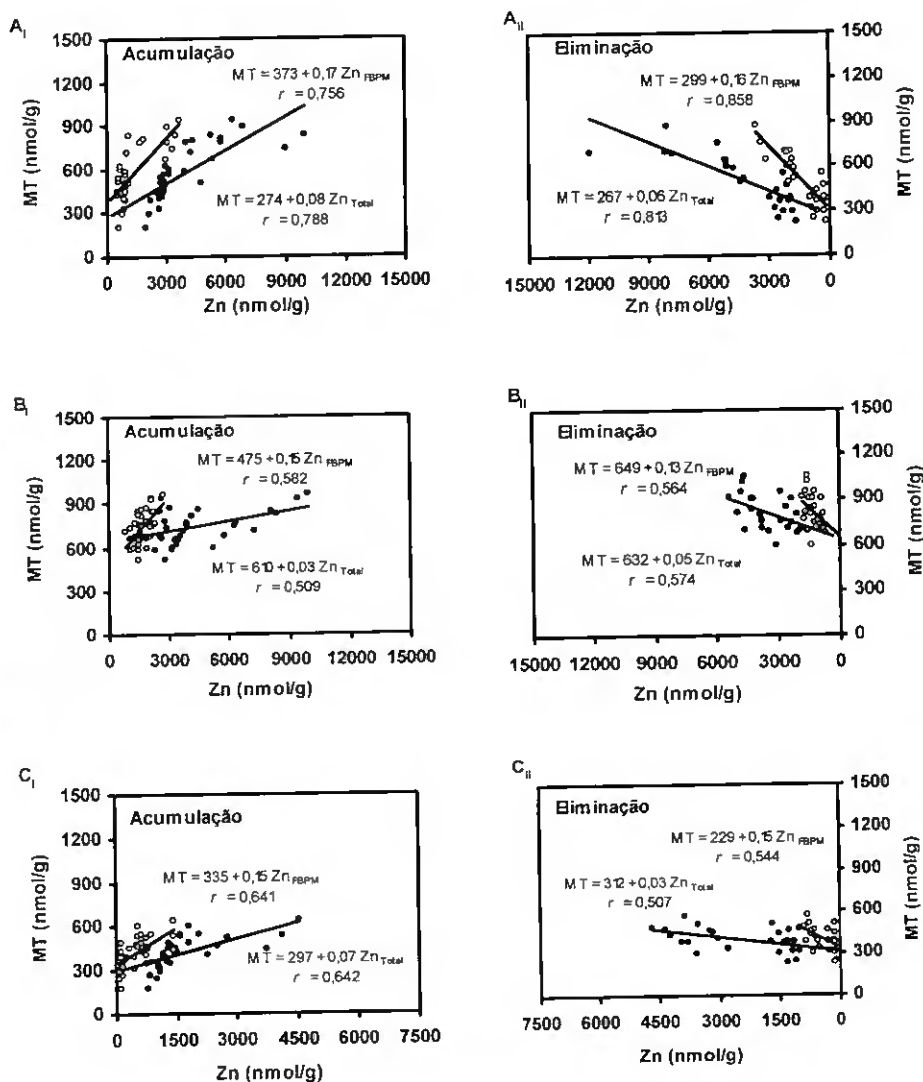


Figura 5.9 - Relação entre as concentrações de MT e Zn nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), durante os períodos de acumulação (I) e de eliminação (II). Total (●) e fração FBPM (○).

Tabela 5.2 – Razão molar MT:Zn na fração FBPM em diferentes tecidos das amêijoas expostas durante 40 dias a 100 e 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Zn e depuradas durante 50 dias.

Dias	Brânquias		Glândula digestiva		Resto	
	100 $\mu\text{g/l}$	1000 $\mu\text{g/l}$	100 $\mu\text{g/l}$	1000 $\mu\text{g/l}$	100 $\mu\text{g/l}$	1000 $\mu\text{g/l}$
0	1:3	1:3	1:2	1:2	1:1	1:1
7	1:2	1:2	1:3	1:3	1:0.2	1:2
14	1:1	1:1	1:2	1:2	1:0.3	1:1
21	1:1	1:2	1:2	1:3	1:1	1:1
30	1:2	1:4	1:2	1:2	1:1	1:2
40	1:2	1:4	1:2	1:3	1:1	1:3
50	1:3	1:4	1:2	1:2	1:0.3	1:2
60	1:2	1:3	1:1	1:2	1:0.4	1:2
75	1:1	1:3	1:1	1:1	1:1	1:2
90	1:1	1:3	1:1	1:2	1:1	1:2

Atendendo à razão molar MT:Zn de 1:7 correspondente à saturação da MT (Otvos *et al.*, 1982), verificou-se que inicialmente esta proteína não está saturada com Zn. À medida que o tempo de exposição aumenta (0 – 40º dia), a razão MT:Zn na fração FBPM em todos os tecidos das amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ não sofreu alterações significativas. Contrariamente, nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas expostas a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ a razão MT:Zn diminui, indicando que ao longo do tempo de exposição o Zn ligou-se a esta proteína. Por outro lado, durante o período de depuração (50 – 90º dia), de uma maneira geral, a razão MT:Zn na fração FBPM apresenta uma tendência crescente, mostrando que o Zn é eliminado desta fração (Tabela 5.2).

5.4. DISCUSSÃO

O principal objectivo deste Capítulo foi o estudo do envolvimento da metalotionina em diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus* exposta a duas concentrações subletais de Zn. Como referido na introdução deste Capítulo (secção 5.1), a utilização da MT como biomarcador de metais essenciais permanece controversa na amêijoia *R. decussatus*, por um lado alguns estudos de campo revelam que a MT reflecte as concentrações ambientais de Zn (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000), enquanto outros mostram que a variação dos níveis de MT não estão relacionados com as concentrações ambientais de Zn (Serafim & Bebianno, 2001; Bebianno & Serafim, 2003). Consequentemente, estudos laboratoriais nesta espécie, que permitam o conhecimento do papel da MT na cinética de acumulação e de eliminação de Zn, nos diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus* são fundamentais, pois apesar da presença de MT na amêijoia *R. decussatus* ter sido demonstrada (Bebianno *et al.*, 1993, 1994, 2000; Bebianno & Serafim, 1998; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000; Gêret & Bebianno, 2004) nunca foi estudada a relação entre as concentrações de MT e de Zn ao longo do tempo de exposição e consequentemente a capacidade deste metal na indução de MT e o modo como esta proteína participa na eliminação deste metal.

O presente estudo mostrou que, de uma forma geral, a indução de MT na presença de excesso de Zn depende dos tecidos de *R. decussatus*, da concentração e do tempo de exposição. De facto, só se observou indução desta proteína nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas expostas a 1000 µg Zn l⁻¹, apesar de na exposição a 100 µg Zn l⁻¹ se ter observado um aumento significativo nos teores desta proteína nos primeiros dias de exposição (Figuras 5.6).

Gêret & Bebianno (2004) também observaram um aumento nos níveis de MT nas brânquias destas amêijoas expostas a 100 µg l⁻¹ ao fim de 3 dias e a 1000 µg l⁻¹ ao fim de 1 dia de exposição, enquanto que na glândula digestiva não existe alteração dos teores desta proteína.

A variação nos níveis de MT está neste caso, relacionada com o padrão de acumulação de Zn, nos diferentes tecidos de *R. decussatus*. A acumulação de Zn

apresenta um comportamento distinto em cada uma das concentrações (100 e 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$). Na exposição a 100 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ os três tecidos regulam parcialmente os níveis de Zn, verificando-se no caso das brânquias e da restante parte edível, um aumento nos teores deste metal no início do período de exposição, mantendo-se posteriormente constantes, enquanto no caso da glândula digestiva este padrão é distinto, em que os teores de Zn apresentam oscilações. Por outro lado, na exposição com 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ todos os tecidos acumulam exponencialmente este metal.

Resultados semelhantes foram obtidos nas brânquias do mexilhão *M. edulis*, em que as concentrações de Zn foram efectivamente reguladas para concentrações mais baixas de Zn (10 e 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) ocorrendo somente uma pequena bioacumulação a 250 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$, onde foi observado uma resposta na indução de MT, tendo aumentado em cerca de 5 vezes comparativamente com os níveis de base (Roesijadi *et al.*, 1988). Também na amêijoia *R. decussatus*, um estudo de transplante mostrou que as brânquias desta espécie acumulam Zn quando exposta a uma concentração ambiental de aproximadamente 100 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ durante 28 dias, no entanto a taxa de acumulação diminuiu ao longo do tempo, parecendo indicar a capacidade de regulação dos níveis deste metal (Castro *et al.*, 1996). O mesmo comportamento foi observado no mexilhão *P. perna* exposto a 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ durante 24 dias, em que se observou um aumento na concentração deste metal para cerca do dobro ao fim de 4 dias, mantendo-se depois inalterado até ao final do ensaio (Anandraj *et al.*, 2002).

A regulação de metais ocorre quando a taxa de assimilação é compensada pela taxa de eliminação do metal, desta forma a regulação dos metais pelos moluscos pode ser conhecida de forma indirecta, quando a quantidade de metal nos tecidos destes organismos não varia relativamente à concentração no ambiente. Existem duas possibilidades dos organismos tolerarem o excesso do influxo do metal: (1) eliminação imediata do metal e/ou (2) armazenamento do metal em excesso em formas metabolicamente inertes, sendo esse armazenamento reversível – podendo ocorrer mobilização deste metal como resposta a requerimentos metabólicos (Langston *et al.*, 1998).

Na exposição a 100 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$, o Zn nos três tecidos das amêijoas encontra-se tal como nas amêijoas não contaminadas, principalmente associado à fracção insolúvel, ou

seja associado a grânulos e a concreções de minerais. A ligação de Zn à fracção I^I também foi encontrada nesta espécie em estudos de campo (Bebianno & Serafim, 2003; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000; Serafim & Bebianno, 2001) e de laboratório (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995). Estes processos ocorrem frequentemente nos moluscos (Viarengo & Nott, 1993; George & Olsson, 1994; Roesijadi, 1994a; Mason & Jenkins, 1995). No entanto, nesta exposição e apesar de não se ter verificado alteração na distribuição subcelular deste metal, existe um aumento considerável de Zn associado às proteínas da fracção citosólica (FEPM e FBPM), mostrando que esta fracção apresenta ligandos disponíveis para se ligarem ao excesso de iões Zn livres. Desta forma, os resultados sugerem que para esta exposição, os tecidos destes organismos apresentam a capacidade de redistribuir o Zn pelas diferentes fracções subcelulares e regular os níveis deste metal.

A regulação dos níveis de Zn é também indicada em algumas espécies de bivalves, incluindo o *M. edulis* (Amiard-Triquet *et al.*, 1986; Phillips & Rainbow, 1988) e *P. viridis* (Chan, 1988). Contudo, os resultados obtidos neste estudo mostram que a regulação do Zn na amêijoia *R. decussatus* pode ser parcial, em que a bioacumulação pode estar relacionada com a exposição deste metal, particularmente em concentrações mais elevadas, como a 1000 µg Zn l⁻¹.

Os diferentes tecidos das amêijoas expostas a 1000 µg l⁻¹, mostraram que apesar da maior quantidade de Zn se encontrar associado à fracção insolúvel, existe uma quantidade considerável de Zn associado à fracção citosólica, mais propriamente à fracção citosólica de baixo peso molecular (FBPM) (~ 30%), na qual se encontram as MTs. De facto, na exposição mais elevada (1000 µg l⁻¹), existiu uma alteração da distribuição subcelular, em que a fracção FBPM passou a apresentar uma percentagem de Zn maior comparativamente com a fracção FEPM (FBPM/FEPM), mostrando que nesta exposição a fracção FBPM apresenta um papel fundamental na incorporação do excesso de iões Zn.

Estes resultados foram confirmados por cromatografia de filtração em gel, a qual mostrou que, o Zn se encontra ligado a proteínas da fracção FBPM das brânquias e da restante parte edível, cujo peso molecular aparente varia entre 10 e 14 KDa e apresentam as mesmas características das MTs detectadas nesta espécie quando

contaminada com Cd (Bebiano *et al.*, 1993; Simões *et al.*, 2003; ver Capítulo I – secção 1.2.1) e noutros moluscos (Duquesne *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 1995; Bordin *et al.*, 1997; Engel, 1999; Ponzano *et al.*, 2001). Nestas fracções encontra-se a maior quantidade de Zn, a maior resposta polarográfica e à absorvância a 220 nm (correspondente à ligação S-Zn). A ligação de Zn a esta proteína também se verifica nas relações positivas e significativas entre as concentrações de Zn e de MT, durante o período de exposição nos diferentes tecidos (Figura 5.13 - A_I, B_I e C_I).

A ligação de Zn às MTs foi também detectada noutras espécies de amêijoas *Protothaca staminea* (Roesijadi, 1980) e *M. balthica* (Johansson *et al.*, 1986), consistente com a função constitutiva e de desintoxicação destas proteínas. De acordo com o modelo funcional para a MT, as exigências de Zn são sustentáveis pelo complexo MT-Zn. Se existir um aumento de Zn e a capacidade da proteína de se ligar a este metal for limitada então o Zn na forma livre estimula a produção de MTmRNA e consequentemente a formação da proteína (MT) (ver Capítulo I – secção 1.2.3). Subsequentemente o destino desta proteína depende da necessidade de Zn. Assim, o complexo metal-proteína degrada-se e o Zn é libertado ou eliminado se não for necessário. No entanto, se o Zn existir em excesso este pode promover a indução de mais MT (Langston *et al.*, 1998).

Na glândula digestiva das amêijoas expostas a 1000 µg l⁻¹, apesar do grande influxo de Zn, o aumento da concentração de MT foi pouco significativo (Figuras 5.3 A_{II} e 5.6 B). Este resultado talvez possa mostrar que, o Zn acumulado se ligue a esta proteína pré-existente neste tecido.

No mexilhão *M. edulis* e na ostra *C. gigas* expostos a 1000 µg l⁻¹ de Zn durante 21 dias, também foi observado um aumento significativo na concentração de MT nas brânquias. Contrariamente na glândula digestiva e apesar dos teores de MT serem mais elevados do que nas brânquias, não foram observadas alterações diferenças significativas nos teores desta proteína (Géret *et al.*, 2002). Por outro lado, no mexilhão *M. galloprovincialis* o Zn não provoca a indução desta proteína, podendo ser sequestrado pela MT pré-existente (Roesijadi *et al.*, 1988; Raspor & Pavicic, 1991). Analogamente, no mexilhão de água doce *Anadonta grandis* a indução da MT é provocada pelo Cd, mas não pelo Cu ou pelo Zn (Couillard *et al.*, 1993).

Durante o período de eliminação foram observadas importantes diferenças entre a cinética de eliminação de Zn, e a dos outros dois metais (Cd e Cu) nesta espécie (Capítulos III e IV). Enquanto, que a concentração de Cd dificilmente é eliminada nos tecidos de *R. decussatus*, o Zn é mais rapidamente eliminado, no entanto com uma velocidade inferior à observada para o outro metal essencial (Cu) (Capítulo IV). Estes resultados mostram que os metais essenciais são mais rapidamente eliminados que os metais não-essenciais. Durante este período, os tecidos desta espécie conseguiram eliminar todo o Zn acumulado nas amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$, à excepção da restante parte edível, enquanto que nas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ só parte dos teores deste metal foi eliminado, mostrando que, para menores níveis de exposição a diferença entre a velocidade de acumulação e de eliminação é menor. Também no mexilhão *P. perna* exposto a $50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ durante 24 dias e posteriormente depurados durante o mesmo período de tempo, a concentração de Zn foi rapidamente regulada mesmo durante o período de exposição não tendo variado durante o período de depuração (Anadraj *et al.*, 2002).

O tempo de meia vida de Zn estimado nas brânquias e na glândula digestiva das amêijoas pré-expostas a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ foi de 15 dias, enquanto que nas pré-expostas a $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ foi de 21 e de 19 dias, respectivamente. Na ostra *C. gigas*, Okazaki & Panietz (1981) e Geffard *et al.* (2002b) determinaram tempos de meia de Zn significativamente superiores aos encontrados nesta espécie, sendo superior nas brânquias comparativamente com a glândula digestiva (57 dias nas brânquias e de 25 dias na glândula digestiva no estudo *in situ* efectuado por Okazaki & Panietz (1981) e 376 e 167 dias nas brânquias e glândula digestiva, respectivamente, num estudo semelhante efectuado por Geffard *et al.* (2002b)). Esta diferença pode dever-se à baixa concentração inicial de Zn nestes tecidos das ostras originárias do estuário de Gironde (Geffard *et al.*, 2002b), mostrando que a depuração de Zn é influenciada pela contaminação prévia dos organismos, como apontado Wallner-Kersanach *et al.* (2000).

O tempo de meia vida de Zn estimado nas diferentes fracções subcelulares para cada um destes tecidos revelou que a fracção citosólica desempenha uma importante função na eliminação de Zn, principalmente a fracção FEPM, na qual se observa um

tempo de meia vida menor (2-15 dias) comparativamente com as outras fracções subcelulares. Na FBPM os teores deste elemento também decresceram rapidamente com tempos de meia vida que variaram entre 3 a 20 dias. Resultados semelhantes foram obtidos por Geffard *et al.* (2002b) na ostra *C. gigas*, em que verificaram que a eliminação de Zn é mais rápida na fracção citosólica comparativamente com a fracção insolúvel. Este facto pode estar relacionado com a fossilização deste metal em inclusões da membrana no meio intracelular, tal como demonstrado na ostra *O. edulis* (George *et al.*, 1978). Também na amêijoia asiática *C. fluminea* pré-exposta *in situ* a Zn no rio Lot (França) a eliminação deste metal esteve essencialmente relacionada com proteínas da fracção citosólica (Baudrimont *et al.*, 2003).

Simultaneamente com a eliminação de Zn, ocorre uma rápida degradação de MT nos tecidos da amêijoia *R. decussatus*, confirmada pela relação positiva e significativa entre os teores desta proteína e a concentração de Zn total e na FBPM, durante o período de depuração (Figura 5.13 A_{II}, B_{II} e C_{II}). O tempo de meia vida de MT (19 dias nas brânquias e 18 dias na restante parte edível) é ligeiramente mais rápido do que o tempo de meia vida do Zn. Similarmente no *M. edulis* a degradação da MT (25 dias) foi mais rápida do que o tempo de meia vida de Zn (60 dias) (Viarengo *et al.*, 1989). Os tempos de meia vida curtos para esta proteína associada ao Zn podem ser explicados em parte pela rápida degradação destas proteínas complexadas com este metal (Baudrimont *et al.*, 2003).

A redistribuição de Zn por parte dos organismos, corresponde à degradação do complexo MT-Zn e a uma eliminação de proteínas de elevado peso molecular. A diferença na cinética de eliminação, entre este metal e o Cd pode ser explicada em parte pela rápida degradação de proteínas complexadas com o Zn, que para além das MTs, podem ser pequenos peptídeos, glutatona, aminoácidos e proteínas de elevado peso molecular, como apontado por Baudrimont *et al.* (2003). De facto, o Zn liga-se à MT com maior afinidade do que a outras proteínas, no entanto, para a MT servir como fonte de distribuição de Zn são necessários mecanismos que possam regular a ligação deste metal. Foi demonstrado que a interacção da MT com a glutatona oxidada (GSSG) ou outros bisulfuritos libertam o Zn, e que a combinação da glutatona

reduzida (GSH) com a GSSG aumenta a transferência de Zn da MT para apoenzimas (Maret & Vallée, 1998).

Estudos efectuados anteriormente com *R. decussatus* exposta às mesmas concentrações de Zn (100 e 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$), mostraram que nas brânquias e na glândula digestiva desta espécie, este metal também afectou a actividade de algumas enzimas antioxidantes, tais como a catalase e a glutathione peroxidase (Géret & Bebianno, 2004). Os autores sugerem que o aumento de actividade das enzimas antioxidantes nos tecidos desta espécie está relacionado com uma tentativa de defesa relativamente às espécies reactivas de oxigénio produzidas pelo Zn, embora este metal não participe em reacções redox. No entanto, nas brânquias das amêijoas expostas a 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$, apesar da activação de algumas enzimas antioxidantes em resposta ao stress oxidativo induzido por este metal de transição, esta resposta não foi suficiente para conferir tolerância à acumulação de Zn, uma vez que os níveis de peroxidação lipídica aumentaram significativamente após a exposição (Géret & Bebianno, 2004).

A combinação dos resultados obtidos no estudo efectuado por Géret & Bebianno (2004) com os encontrados neste estudo, parecem mostrar que o Zn pode afectar de forma mais evidente a actividade de algumas enzimas antioxidantes, do que os níveis de MT, no entanto e à semelhança do Capítulo IV, os perfis cromatográficos obtidos nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas expostas a 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ revelaram que o Zn na fracção FBPM eluiu nas mesmas fracções que a maior quantidade de compostos tiólicos (>50%), coincidente com as fracções de peso molecular semelhante ao da MT. Por este motivo, e tal como para a resposta da MT relativamente aos teores de Cu, a análise directa por PDI poderá ser utilizada na determinação dos teores de MT, apesar dos resultados finais poderem estar sobrestimados entre 30-40%, uma vez que existe uma parte considerável de grupos tiólicos que eluem noutras fracções.

De uma forma geral, podemos concluir que a MT, participa na homeostasia do Zn nos tecidos das amêijoas *R. decussatus* exposta à concentração mais baixa, enquanto que na exposição mais elevada esta proteína desempenha além disso, um papel fundamental na desintoxicação do excesso de iões Zn. No entanto, os resultados deste capítulo mostram que o comportamento da MT além de ser dependente da

concentração de exposição, está também relacionado com a função dos diferentes tecidos, tal como observado para o Cu (Capítulo IV). A MT é induzida em resposta à exposição a Zn nas brânquias, sendo essa indução superior à dos outros tecidos e função da concentração e do tempo de exposição. Na glândula digestiva a MT, apesar de apresentar os teores mais elevados, não é induzida. Por último, a MT na restante parte edível apresenta um comportamento semelhante ao das brânquias, mas o nível de indução é inferior. Por outro lado, esta proteína também participa de forma activa na eliminação deste metal, através da sua rápida degradação.

Capítulo VI **CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE CÁDMIO, COBRE E ZINCO
NOS TECIDOS DA AMÊIJOA *Ruditapes decussatus*
APÓS EXPOSIÇÃO A UMA MISTURA METÁLICA:
O PAPEL DA METALOTIONINA**

6.1. INTRODUÇÃO

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.3. RESULTADOS

6.4. DISCUSSÃO

6.1. INTRODUÇÃO

Para melhor compreender o efeito dos metais, nomeadamente Cd, Cu e Zn, na resposta da MT em organismos aquáticos é importante considerar que, no ambiente natural estes organismos estão expostos não a uma exposição individual de cada um destes metais, mas sim a uma mistura destes ao mesmo tempo ou em tempos relativamente próximos (Kraak *et al.*, 1993). De facto, em ambientes aquáticos sujeitos a fontes de contaminação, como actividades industriais e escorrências agrícolas, é frequente encontrar uma mistura de metais no ambiente, como no caso do Cd e Zn e mesmo do Cu, pois geralmente estes elementos encontram-se associados (Dethloff *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2002).

Da exposição a uma mistura metálica podem resultar interacções toxicológicas, as quais podem produzir uma resposta biológica quantitativa ou qualitativa diferente da resultante da acção de cada um dos metais separadamente. As interacções entre estes metais podem ocorrer a diferentes níveis, ex. absorção, ligação a proteínas, biotransformação e excreção destes elementos. Estas respostas resultantes da exposição simultânea a vários elementos metálicos, tal como referido no Capítulo I (secção 1.1.3.2) podem corresponder a um efeito aditivo, sinérgico ou antagónico (Rand, 1995).

O efeito de uma mistura metálica nos organismos depende do tipo, quantidade e da concentração destes. Khalil *et al.* (1996), sugerem que uma mistura metálica com poucos metais e em concentrações elevadas podem ter efeitos antagónicos ou sinérgicos, enquanto que uma mistura metálica com muitos metais e em concentrações baixas dominam os efeitos aditivos. No entanto, Hagopian-Schlekat *et al.* (2001) consideram que os efeitos das misturas metálicas são difíceis de generalizar e tendem a ser específicos do grupo taxinómico.

Em larvas de mexilhão *M. galloprovincialis* a exposição de Cd e Zn apresentam um efeito antagónico na acumulação destes elementos, observando-se uma maior indução de MT quando os organismos foram sujeitos à mistura destes dois metais (Pavicic *et al.*, 1994b). Na ostra *C. virginica* exposta à mistura de Cd e Cu, também foi observado um aumento dos níveis de MT comparativamente com a exposição individual de Cd

(Engel, 1999). Por outro lado, no mexilhão água doce *D. polymorpha* a mistura de Cd + Cu não afectou a indução de MT relativamente à exposição individual destes metais (Lecoeur *et al.*, 2004).

O aumento da toxicidade resultante da presença de uma mistura de metais pode ser devido a vários factores, por exemplo se dois ou mais metais afectam o mesmo alvo (função biológica) num organismo a sua ocorrência na mistura pode aumentar as respostas tóxicas (Mason & Jenkins, 1995). A interacção entre metais da "classe B", como o Cd, Cu e Zn é esperada, devido às suas propriedades bioquímicas (Beeby, 1991). A sua afinidade por alvos similares faz com que estes metais compitam dentro dos tecidos. Esta competição sugere um modo de acção semelhante, o que poderá indiciar que os metais apresentem efeitos aditivos. De facto, a substituição de metais essenciais como o Cu e Zn é um dos mecanismos subjacentes à toxicidade do Cd (Weltje, 1998).

Existem vários estudos em diferentes organismos que evidenciam a interacção entre estes metais. A diminuição da concentração de Zn após a exposição ao Cd foi observada na larva do insecto aquático *Chironomus riparius* (Postma *et al.*, 1995) e na estrela-do-mar *Asterias rubens* (Den Besten *et al.*, 1991). A acumulação de Zn ou Cd fez diminuir a concentração de Cu nos isópodes terrestres *Porcellio scaber*, especialmente no hepatopâncreas onde estes organismos acumulam metais (Donker *et al.*, 1996). Por outro lado, na amêijoia de água doce *Anodonta cygnea* o transporte de Cd nos tecidos foi acelerada pela exposição simultânea de Zn (Hemelraad *et al.*, 1987). Van Capelleveen (1987) sugere que este sinergismo na incorporação de metais é devido à indução de MT pelo Cd. Um padrão idêntico foi observado para outros metais, em que a incorporação de Zn aumentou com a exposição simultânea de Cu no anelídeo aquático *Enchytraeus crypticus* (Posthuma *et al.*, 1997). Ainda no mexilhão de água doce *D. polymorpha* exposto à mistura de Cd, Cu e Zn, Kraak *et al.* (1994) demonstrou um efeito aditivo, enquanto que no copépode *Amphiascus tenuiremis* exposto a Cd, Cu, Ni, Pb e Zn o efeito da mistura destes metais foi mais que aditivo (Hagopian-Schlekat *et al.*, 2001).

Como referido ao longo deste trabalho, a nível intracelular os metais essenciais e não-essenciais dependem fortemente de moléculas contendo grupos tiólicos, como as

metalotioninas. Quando se pretende estudar o papel da metalotionina em processos de acumulação de metais nos tecidos de moluscos bivalves, os ensaios laboratoriais tornam-se essenciais para compreender os mecanismos associados a interacção entre esta proteína e os respectivos metais. Desta forma, a utilização de ensaios que reflectam situações mais próximas do ambiente natural (mistura metálica), permite conhecer a forma como os metais interactivam entre si e consequentemente a forma como são retidos nos diferentes tecidos destes organismos, quer ao nível da sua distribuição subcelular quer à sua ligação com determinados ligandos, como a metalotionina.

Na amêijoia *R. decussatus* não existe informação disponível sobre o resultado de ensaios laboratoriais utilizando exposições polimetálicas. Desta forma, este Capítulo pretende fazer uma análise comparativa entre a resposta da metalotionina nos diferentes tecidos de *R. decussatus* exposta individualmente a Cd, Cu e Zn e exposta simultaneamente a estes metais. Tendo em consideração os resultados obtidos nos Capítulos anteriores, em que se verificou que a maior indução de MT nos tecidos desta amêijoia ocorreu na exposição a $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Capítulo IV), foi utilizada esta concentração de Cu para o estudo do efeito da exposição polimetálica. Desta forma, foi utilizada uma mistura de Cd, Cu e Zn aproximadamente na mesma proporção atómica e correspondendo a uma concentração de $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ e $50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$. Nesta análise serão utilizados alguns dados obtidos anteriormente nos tecidos desta espécie, resultantes de exposições individuais com a mesma concentração que a mistura metálica (Bebiano & Serafim, 1998; Serafim, 1993).

Assim, o objectivo deste capítulo é analisar o papel das MTs no processo de acumulação conjunta de Cd, Cu e Zn em diferentes tecidos de *R. decussatus*, após uma exposição a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ e $50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, durante 25 dias. Os processos de acumulação foram seguidos em condições laboratoriais controladas na tentativa de ajustar modelos cinéticos que permitam determinar coeficientes, para uma melhor comparação e compreensão dos mecanismos associados à incorporação destes metais individualmente e simultaneamente. Esta aproximação foi feita na tentativa de responder à seguinte questão:

(i) Qual a cinética de acumulação de Cd, Cu e Zn nos diferentes tecidos de *R. decussatus* numa exposição polimetálica? Como pode a indução de MT influenciar essa cinética?

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Tal como nos ensaios anteriores, as amêijoas *R. decussatus* (30-35 mm) utilizadas neste ensaio foram recolhidas na Ria Formosa, num local afastado de fontes antrópicas. Decorrido o período de aclimação, as amêijoas foram expostas a uma mistura de Cd, Cu e Zn numa proporção atómica aproximadamente semelhante.

Para tal, lotes de 60 indivíduos foram colocados em 6 aquários, com um volume de 10 litros. Três aquários serviram de controlo experimental e três foram contaminados com uma mistura metálica com uma concentração de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck), $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck) e $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de cloreto de zinco ($\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck), durante 25 dias. Os parâmetros físico-químicos foram controlados durante todo o ensaio e variaram menos de 5%.

Retiraram-se aleatoriamente, sem reposição, amostras de seis indivíduos por aquário, após 0, 7, 14, 21 e 25 dias. Os organismos de cada amostra foram dissecados separando-se as brânquias, a glândula digestiva e a restante parte do corpo (manto, pé e músculos adutores). O processamento de cada um dos tecidos seguiu o tratamento descrito no Capítulo II (secção 2.2).

Foi determinada a concentração de Cd, Cu e Zn no homogeneizado total e nas diferentes fracções subcelulares (fracção residual - FI, fracção proteica de elevado peso molecular - FEPM e fracção proteica de baixo peso molecular - FBPM) de cada um dos tecidos. O doseamento dos metais foi efectuado por EAA com chama ou câmara de grafite, após as amostras terem sofrido um pré-tratamento descrito no Capítulo III (secção 3.2.1), enquanto que os teores de MT foram determinados na fracção FBPM, por polarografia diferencial com impulsos de acordo com o método descrito por Bebianno & Langston (1989).

A validação das concentrações de metais obtidas neste estudo foi determinada utilizando-se materiais de referência, nomeadamente tecido de ostra (NBS) (National Institute of Standards & Technology), em que os valores certificados

comparativamente com valores determinados no laboratório para Cd, Cu e Zn, encontram-se nos capítulos III (secção 3.2.1), IV (secção 4.2.1.2) e V (secção 5.2.1), respectivamente. As concentrações de cada metal e de MT estão expressas em nmol g^{-1} de peso seco do tecido inicialmente homogeneizado, tendo sido usado para a MT uma massa molecular de 7328 Da (Simes *et al.*, 2003).

6.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variabilidade das concentrações dos diferentes metais e de MT ao longo do tempo foi testada nos diferentes tecidos através da análise de variância (ANOVA) a duas entradas, considerando como variáveis independentes o tempo e o tecido. Para discriminar as diferenças entre cada uma das variáveis foi utilizado o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Aos dados de acumulação dos metais nos distintos tecidos foi aplicado um modelo cinético de 1ª ordem (tal como descrito no Capítulo III – secção 3.2.2).

Foram também efectuadas análises de regressão (lineares e múltiplas) entre as concentrações de cada metal e os teores de MT, para um nível de significância de 0,05.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. CONCENTRAÇÃO METÁLICA NOS TECIDOS *R. decussatus*

6.3.1.1. Concentração de Cd

A concentração (média $\pm \sigma$) de Cd (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias, encontra-se na Tabela 6.1. Os valores da concentração de Cd obtidos durante o ensaio laboratorial encontram-se em anexo (Tabela A.10 em Anexo).

Tabela 6.1 - Concentração de Cd (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias (os valores correspondem média $\pm \sigma$).

		Controlo	Mistura metálica
Brânquias	Total	$5,52 \pm 1,45$	780 ± 40
	FI	$1,32 \pm 0,41$ (28)	203 ± 21 (27)
	FEPM	$1,57 \pm 0,55$ (34)	61 ± 13 (8)
	FBPM	$1,80 \pm 0,43$ (38)	486 ± 84 (65)
Gl. digestiva	Total	$32,92 \pm 9,68$	1253 ± 175
	FI	$4,20 \pm 0,73$ (16)	354 ± 66 (26)
	FEPM	$9,29 \pm 1,67$ (36)	124 ± 35 (9)
	FBPM	$12,26 \pm 4,60$ (48)	874 ± 73 (65)
Resto	Total	$2,28 \pm 0,74$	389 ± 84
	FI	$0,96 \pm 0,24$ (29)	154 ± 43 (40)
	FEPM	$1,14 \pm 0,17$ (35)	33 ± 6 (8)
	FBPM	$1,19 \pm 0,22$ (36)	202 ± 45 (52)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de Cd em cada uma das frações subcelulares.

Tal como descrito no Capítulo III, os teores de Cd (total e nas frações subcelulares) nos três tecidos das amêijoas não contaminadas não variaram significativamente ao longo do ensaio experimental ($p > 0,05$). O tecido com teores de Cd mais elevados foi a glândula digestiva (com teores cerca de 6 vezes superiores aos observados nas brânquias e 14 vezes superiores aos da restante parte edível), existindo também

diferenças significativas nas concentrações de Cd entre todos os tecidos ($p < 0,05$) e verificando-se a mesma distribuição subcelular (Tabela 6.1 e Capítulo III – secção 3.3.1).

Na Figura 6.1 encontra-se a evolução da concentração de Cd (total e fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica durante 25 dias. O ensaio só teve a duração de 25 dias porque os organismos não resistiram a um período superior de exposição, verificando-se 100% de mortalidade a partir desse dia.

A concentração total de Cd nas brânquias das amêijoas expostas à mistura metálica (Figura 6.1-A), aumentou linearmente até ao 21º dia de exposição ($p < 0,05$), com uma velocidade de acumulação de $34,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,952$), a qual foi significativamente superior às amêijoas expostas individualmente a 4 µg Cd l^{-1} ($3,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e a 40 µg Cd l^{-1} ($22,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Capítulo III – secção 3.3.1.1). Entre o 21 e 25º dia de exposição não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de Cd ($772 \pm 12 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$).

Nas fracções subcelulares do mesmo tecido, a evolução da concentração de Cd durante o período de exposição foi distinta em cada uma das fracções. Contrariamente ao observado nas exposições individuais deste metal, em que a concentração de Cd na fracção FBPM aumentou linearmente durante todo o período de exposição (Capítulo III – secção 3.3.1.1), nas brânquias das amêijoas expostas à mistura metálica os teores de Cd nesta fracção aumentaram linearmente apenas até ao 14º dia de exposição, no entanto com uma velocidade de acumulação significativamente superior à observada nas exposições individuais ($31,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $r = 0,997$; $p < 0,05$). Após este período foram observadas diferenças significativas entre as concentrações deste elemento ($471 \pm 20 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 6.1-A).

Por outro lado, os teores de Cd na fracção insolúvel (FI), tal como nas exposições individuais (Capítulo III – secção 3.3.1.1), aumentaram linearmente até ao 21º dia de exposição, com uma velocidade de acumulação de $9,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,878$; $p < 0,05$), a qual também é significativamente superior à observada nas exposições individuais

($p < 0,05$). Após este período a concentração de Cd não variou significativamente entre o 21 e 25º dia de exposição ($214 \pm 16 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 6.1-A).

Na fracção FEPM, a concentração de Cd apenas aumentou significativamente durante os primeiros 7 dias de exposição ($p < 0,05$), mantendo-se inalterada no restante período de exposição ($59 \pm 6 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 6.1-A). Este comportamento foi semelhante ao da exposição individual a 40 g Cd l^{-1} , em que os teores de Cd não sofreram qualquer alteração significativa a partir do 14º dia de exposição (Capítulo III – secção 3.3.1.1).

De uma forma geral, os teores de Cd nas brânquias expostas à mistura metálica foram acumulados nas diferentes fracções subcelulares com velocidades significativamente superiores comparativamente com as observadas nas exposições individuais, no entanto, a acumulação ocorreu durante um período de tempo mais curto, à excepção da fracção FI (Figura 6.1-A).

A acumulação de Cd na glândula digestiva das amêijoas expostas à mistura metálica apresentou um comportamento distinto comparativamente com o observado nas exposições individuais a este metal (Capítulo III – secção 3.3.1.1), em que a concentração de Cd (total e nas fracções subcelulares) aumentou exponencialmente durante todo o período de exposição. A concentração de Cd total na glândula digestiva das amêijoas expostas à mistura metálica aumentou linearmente apenas até ao 14º dia de exposição, com uma velocidade de acumulação significativamente superior à observada nas brânquias ($84,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $r = 0,933$; $p < 0,05$) e entre o 14 e 25º dia de exposição não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações deste metal ($1227 \pm 240 \text{ nmol g}^{-1}$) ($p < 0,05$). Na fracção FBPM a concentração de Cd também aumentou linearmente até ao 14º dia de exposição ($p < 0,05$), com uma velocidade de acumulação de $63,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,926$). Por outro lado, na fracção FI a concentração de Cd aumentou significativamente nos primeiros 7 dias de exposição ($p < 0,05$), não variando posteriormente entre o 7 e o 21º dia de ensaio ($255 \pm 18 \text{ nmol g}^{-1}$). Após este período os teores de Cd só aumentaram significativamente no último dia de exposição ($p < 0,05$). Por último, na fracção FEPM a concentração deste elemento aumentou linearmente até ao 21º dia de

exposição ($p < 0,05$), com uma velocidade de acumulação de $7,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,941$), diminuindo significativamente no último dia de exposição ($p < 0,05$) (Figura 6.1-B).

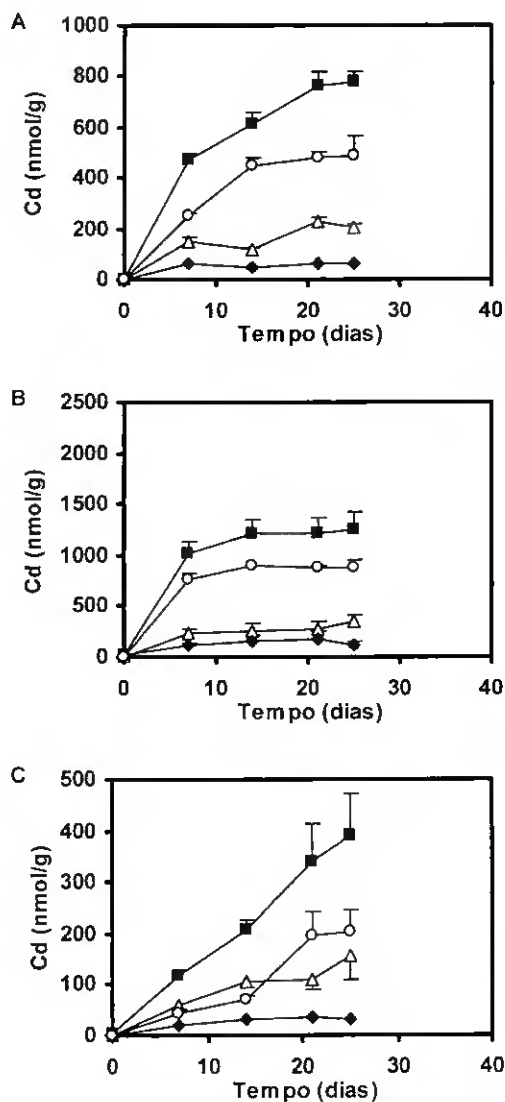


Figura 6.1 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cd total e nas diferentes frações subcelulares nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM)

Contrariamente aos tecidos anteriores, a restante parte edível das amêijoas (total e fracções subcelulares) acumulou o Cd linearmente durante todo o período de exposição, tal como observado nas exposições individuais a este metal (Capítulo III – secção 3.3.1.1), embora com velocidades de acumulação de Cd significativamente inferiores à dos outros tecidos (Total: $15,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,998$; $p<0,05$), FBPM: $8,7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,974$; $p<0,05$), FI: $5,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,931$; $p<0,05$) e FEPM: $1,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r=0,968$; $p<0,05$). No entanto, e contrariamente ao observado nas exposições individuais, o Cd na fracção FI até ao 14º dia apresentou um incremento superior relativamente às outras fracções subcelulares, tendo os níveis deste metal na FBPM aumentando só a partir do 20º dia, correspondendo no final do período de exposição à fracção com a maior percentagem de Cd (Figura 6.1-C).

Duma forma geral, e tal como observado para as amêijoas não contaminadas, a glândula digestiva foi o tecido que apresentou os teores de Cd mais elevados nas amêijoas expostas à mistura metálica, tendo aumentado em relação ao controlo cerca de 38 vezes ao fim de 25 dias de exposição. Contudo nas brânquias e na restante parte edível, o incremento da concentração de Cd foi superior, observando-se um aumento de aproximadamente 140 e 170 vezes, respectivamente (Tabela 6.1).

A distribuição subcelular de Cd ao fim de 25 dias de exposição alterou-se relativamente à observada nos tecidos das amêijoas não contaminadas. À semelhança das exposições individuais (Capítulo III – secção 3.3.1.1), a percentagem de Cd ligada à fracção FBPM aumentou significativamente nos três tecidos, passando a conter mais de 50% do total de Cd acumulado ($p<0,05$). Por outro lado, a fracção FI passou a conter mais Cd comparativamente com a fracção FEPM. Desta forma verifica-se que ao fim do período de exposição todos os tecidos de *R. decussatus* apresentam a mesma distribuição subcelular de Cd: FBPM > FI > FEPM (Tabela 6.1).

Aplicou-se um modelo cinético de 1ª ordem aos dados de acumulação de Cd (Figura 6.2). Tal como, nas brânquias das amêijoas expostas a $40 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Capítulo III – secção 3.3.1.1), o ajuste só foi significativo para as concentrações de Cd total e nas diferentes fracções subcelulares das brânquias e da glândula digestiva das amêijoas expostas à mistura metálica (Figura 6.2).

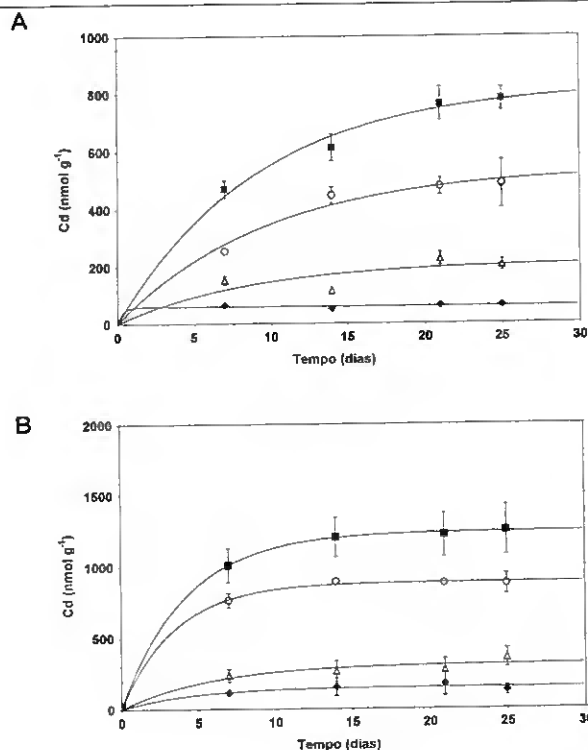


Figura 6.2 - Concentração de Cd (média \pm σ) total e nas diferentes frações subcelulares e evolução prevista pelo modelo cinético de 1^a ordem, nas brânquias (A) e na glândula digestiva (B) das amêijoas expostas a 100 µg Cd l⁻¹, 50 µg Cu l⁻¹, 50 µg Zn l⁻¹, durante 25 dias.

(■) Total; (Δ) FI; (♦) FEPM; (○) FBPM

A taxa de assimilação (K_a) e a taxa de eliminação (K_d) de Cd calculadas encontram-se na Tabela 6.2. As taxas de assimilação (K_a) e de eliminação (K_d) no total e nas frações subcelulares, à exceção da FEPM, são de uma forma geral superiores na glândula digestiva comparativamente com as brânquias (Tabela 6.2), indicando que as brânquias de *R. decussatus* assimilam e eliminam os teores de Cd acumulados mais rapidamente. Por outro lado, verifica-se que o factor de bioconcentração (FBC) é superior na glândula digestiva, quer no total quer nas diferentes frações subcelulares. Nas diferentes frações subcelulares o FBC é superior na fração FBPM em ambos os tecidos (Tabela 6.2), tal como observado nas brânquias das amêijoas expostas a 40 µg Cd l⁻¹, durante 40 dias (Capítulo III – secção 3.3.1.1).

Tabela 6.2 – Factor de bioconcentração (FBC), taxa constante de acumulação (K_a) e taxa constante de eliminação (K_e) nas brânquias e na glândula digestiva (total e fracções subcelulares) das amêijoas expostas a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, durante 25 dias.

	Brânquias				Glândula digestiva			
	FBC	K_a (dia^{-1})	K_e (dia^{-1})	r	FBC	K_a (dia^{-1})	K_e (dia^{-1})	r
Total	933	103	0,110	0,991	1399	334	0,238	0,974
FI	241	28	0,115	0,900	353	58	0,170	0,895
FEPM	66	198	2,989	0,964	170	36	0,214	0,769
FBPM	606	63	0,104	0,978	997	286	0,280	0,995

FBC - Factor de bioconcentração que corresponde a K_a / K_e ;

6.3.1.2. Concentração de Cu

A concentração (média $\pm \sigma$) de Cu (total e fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias, encontra-se na Tabela 6.3. Os valores da concentração de Cu obtidos durante o ensaio laboratorial encontram-se em anexo (Tabela A.11 em Anexo).

Os teores de Cu (total e fracções subcelulares) nos três tecidos das amêijoas não contaminadas não variaram significativamente ao longo do ensaio experimental ($p > 0,05$). Tal como referido no Capítulo IV (secção 4.3.2), a glândula digestiva foi o tecido com teores mais elevados de Cu, com uma concentração significativamente superior à observada nas brânquias e na restante parte edível ($p < 0,05$) (Tabela 6.3). A distribuição subcelular de Cu nas amêijoas não contaminadas, foi semelhante à observada no Capítulo IV, ou seja os teores de Cu foram mais elevados na fracção FBPM nas brânquias (62%) e na glândula digestiva (47%), enquanto que na restante parte edível foi a fracção FI que apresentou os teores mais elevados (44%). Assim, observou-se para cada tecido a seguinte ordem de distribuição: FBPM > FEPM > FI nas brânquias e na glândula digestiva e FI > FEPM > FBPM na restante parte do corpo (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Concentração de Cu (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes fracções subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica de $100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, ao fim de 25 dias. (os valores correspondem média $\pm \sigma$).

		Controlo	Mistura metálica
Brânquias	Total	$84,0 \pm 9,0$	889 ± 62
	FI	$11,5 \pm 3,0$ (14)	287 ± 37 (27)
	FEPM	$20,0 \pm 7,5$ (24)	206 ± 46 (20)
	FBPM	$52,5 \pm 16,6$ (62)	565 ± 54 (53)
Gl. digestiva	Total	$229 \pm 38,6$	1795 ± 89
	FI	$26,4 \pm 5,1$ (12)	221 ± 12 (12)
	FEPM	$94,4 \pm 12,3$ (41)	273 ± 17 (15)
	FBPM	$109 \pm 13,1$ (47)	1302 ± 60 (73)
Resto	Total	$60,4 \pm 16,3$	302 ± 40
	FI	$35,4 \pm 5,9$ (44)	189 ± 29 (38)
	FEPM	$29,5 \pm 3,8$ (37)	142 ± 20 (28)
	FBPM	$15,3 \pm 2,8$ (19)	170 ± 18 (34)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de Cu em cada uma das fracções subcelulares.

Na Figura 6.3 encontra-se a evolução da concentração de Cu total e nas diferentes fracções subcelulares nas brânquias, na glândula digestiva e na restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica, durante 25 dias.

A concentração total de Cu nas brânquias das amêijoas expostas à mistura metálica aumentou linearmente e significativamente durante todo o período de exposição, tal como nas exposições individuais (25 e $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$) (Capítulo IV – secção 3.4.2.1). A velocidade de acumulação nas brânquias das amêijoas expostas à mistura ($32,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $r = 0,987$; $p < 0,05$) foi significativamente superior à observada na exposição a $25 \mu\text{g l}^{-1}$ ($p < 0,05$), sendo no entanto, semelhante à observada na exposição a $50 \mu\text{g l}^{-1}$, a qual, corresponde à mesma concentração que a utilizada na mistura metálica.

Os teores de Cu nas fracções subcelulares também aumentaram linearmente durante todo o período de exposição, tal como nas exposições individuais (25 e $50 \mu\text{g l}^{-1}$) (Capítulo IV – secção 3.4.2.1). As velocidades de acumulação em cada uma das fracções ($26,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,989$; $p < 0,05$) na fracção FBPM, $10,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,977$; $p < 0,05$) na fracção FEPM e $10,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,966$; $p < 0,05$) na fracção FI)

(Figura 6.3-A), também não foram significativamente diferentes das observadas na exposição individual com a mesma concentração de Cu (Capítulo IV – seção 3.4.2.1 (Tabela 4.4)).

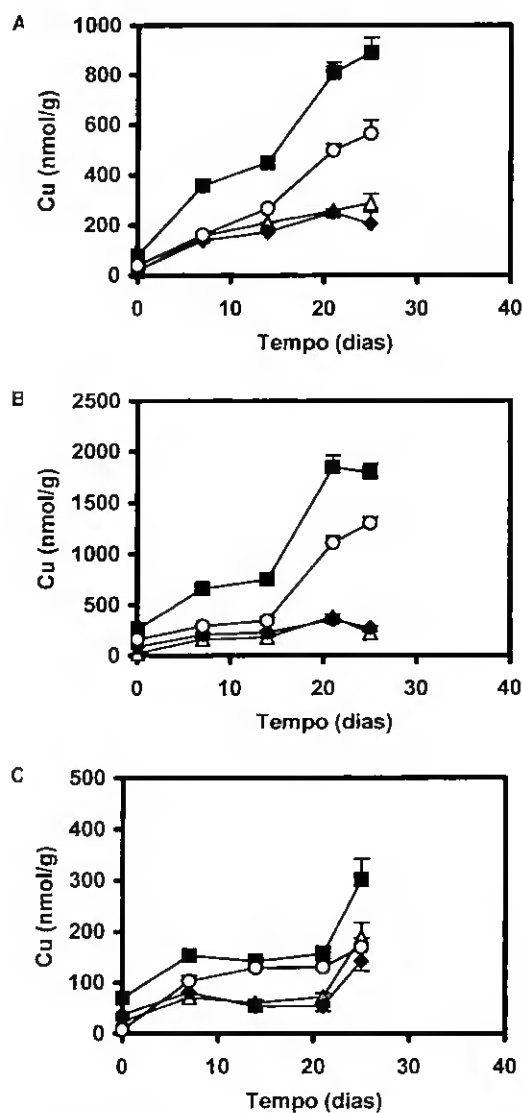


Figura 6.3 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cu total e nas diferentes frações subcelulares nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica de $100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, durante 25 dias. (■ Total; △ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM)

À semelhança das brânquias, o Cu foi acumulado linearmente na glândula digestiva durante os primeiros 21 dias de exposição, tanto na exposição à mistura metálica como nas exposições individuais (Figura 6.3-B e Capítulo IV – secção 3.4.2.1). Este tecido acumulou o Cu com velocidade significativamente superior à observada nas brânquias ($69,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,921$)). A concentração de Cu nas fracções subcelulares também aumentou linearmente durante o período de exposição ($57,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,926$; $p < 0,05$) na fracção FBPM, $11,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,954$; $p < 0,05$) na fracção FEPM e $15,7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,954$; $p < 0,05$) na fracção FI (Figura 6.3 B). No entanto, nas fracções FI e FEPM este aumento linear só ocorreu até ao 21º dia, após este dia a concentração de Cu nestas fracções decresceu significativamente no último dia de exposição (25º dia) ($p < 0,05$).

Contrariamente ao observado nas brânquias, as velocidades de acumulação (total e fracções subcelulares) na glândula digestiva das amêijoas expostas à mistura metálica foram significativamente inferiores às observadas na exposição individual com a mesma concentração de Cu ($50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) ($p < 0,05$), à excepção da fracção FBPM, na qual não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) (Capítulo IV – secção 3.4.2.1).

Os teores de Cu na restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica aumentaram significativamente nos primeiros 7 dias de exposição, após os quais se mantiveram inalterados até ao 21º dia e aumentando novamente entre o 21 e 25º dia ($p < 0,05$) (Figura 6.3-C). Os teores de Cu nas diferentes fracções subcelulares apresentaram o mesmo comportamento que no total do tecido ao longo do tempo de exposição. No entanto, nas fracções FI e FEPM os teores de Cu aumentaram cerca de 2,5 vezes do dia 21º para o 25º, em que os teores de Cu na fracção FI ultrapassaram os da FBPM, os quais foram sempre significativamente superiores até ao 21º dia de exposição ($p < 0,05$) (Figura 6.3-C). À semelhança da glândula digestiva, na restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica, a concentração de Cu (total e fracções subcelulares) no final do período de exposição foi significativamente inferior à observada na exposição individual com $50 \text{ } \mu\text{g Cu l}^{-1}$ ($p < 0,05$), à excepção da fracção FBPM, na qual não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) (Capítulo IV – secção 3.4.2.1).

No final do período de exposição à mistura metálica, os teores de Cu (total e fracções subcelulares) nos três tecidos das amêijoas foram significativamente superiores ao controlo ($p < 0,05$) (Tabela 6.3). Tal como observado para as amêijoas não contaminadas, a glândula digestiva foi o tecido que apresentou os teores de Cu mais elevados, tendo aumentado em relação ao controlo cerca de 9 vezes ao fim de 25 dias de exposição. Contudo nas brânquias o incremento da concentração de Cu foi superior, observando-se um aumento 11 vezes relativamente ao controlo e por último a restante parte edível em que os teores de Cu aumentaram cerca de 5 vezes relativamente ao mesmo tecido das amêijoas não contaminadas (Tabela 6.3).

A distribuição subcelular de Cu nas brânquias das amêijoas expostas à mistura metálica no final do período de exposição foi distinta da observada nas amêijoas não contaminadas (a percentagem de Cu na fracção FBPM decresceu significativamente e na fracção FI aumentou ($p < 0,05$)), observando-se no entanto, a seguinte distribuição: FBPM > FI > FEPM (Tabela 6.3). Esta distribuição foi distinta da observada na exposição individual com $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ (FBPM > FEPM > FI) (Capítulo IV – secção 3.4.2.1).

Na glândula digestiva o padrão distribuição de Cu foi semelhante ao amêijoas não contaminadas, no entanto verificou-se um aumento significativo da percentagem de Cu na fracção FBPM e uma diminuição na fracção FEPM ($p < 0,05$), observando-se a seguinte distribuição: FBPM > FEPM > FI (Tabela 6.3), a qual foi semelhante à observada na exposição individual com $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Capítulo IV – secção 3.4.2.1).

Tal como nas brânquias a distribuição subcelular de Cu na restante parte edível das amêijoas contaminadas foi distinta da observada no controlo (FI > FBPM > FEPM), observando-se um aumento significativo de Cu na fracção subcelular FBPM (Tabela 6.3), tal como observado na exposição individual com $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Capítulo IV – secção 3.4.2.1).

À semelhança do ensaio efectuado com $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Capítulo IV – secção 3.4.2.1), aos dados de acumulação de Cu nos diferentes tecidos *R. decussatus* foi ajustado um modelo cinético de 1ª ordem. Este ajuste não foi significativo em todas as fracções subcelulares dos diferentes tecidos das amêijoas (Figura 6.4).

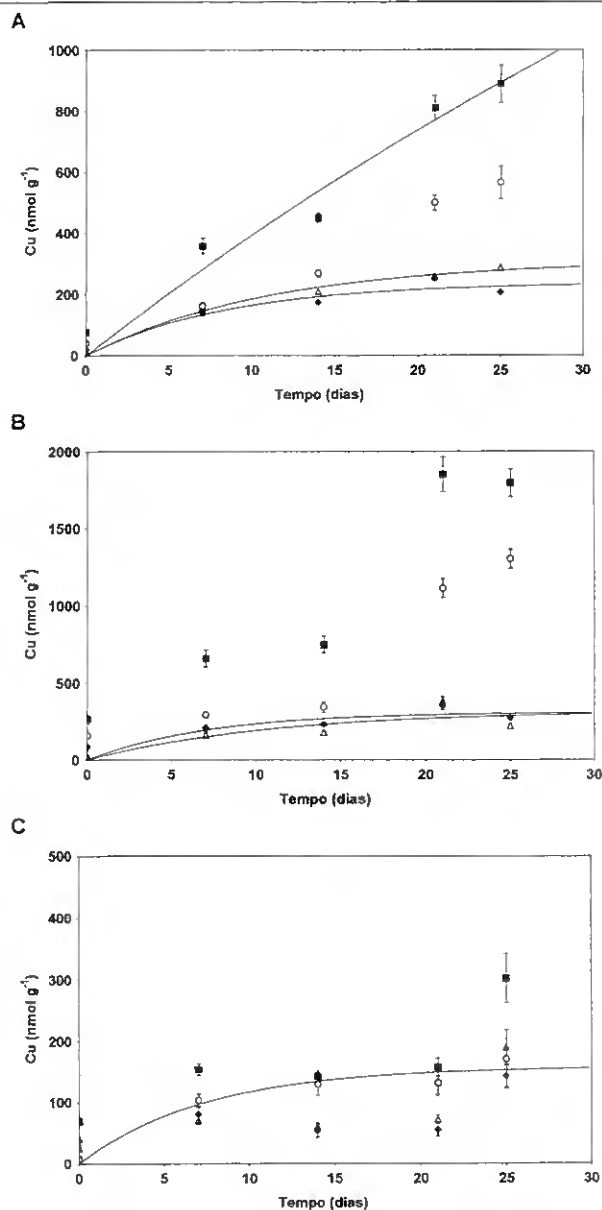


Figura 6.4 – Concentração de Cu (média $\pm \sigma$) total e nas diferentes frações subcelulares observada e prevista pelo modelo cinético de 1^a ordem, nas brânquias (A) glândula digestiva (B) e restante parte edível (C) das amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$), durante 25 dias. (■ Total; Δ FI; \blacklozenge FEPM; \circ FBPM).

Nestes tecidos, foi possível calcular, a taxa de assimilação e a taxa de eliminação de Cu, durante o período em que os organismos estiveram expostos a este metal (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 – Factor de bioconcentração (FBC), taxa constante de acumulação (K_a) e taxa constante de eliminação (K_e) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível (total e fracções subcelulares) das amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ + $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ + $50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$), durante 25 dias.

	Brânquias				Gl. digestiva				Resto			
	FBC	K_a (dia^{-1})	K_e (dia^{-1})	r	FBC	K_a (dia^{-1})	K_e (dia^{-1})	r	FBC	K_a (dia^{-1})	K_e (dia^{-1})	r
Total	4015	54	0,013	0,972	-	-	-	-	-	-	-	-
FI	394	36	0,091	0,991	410	37	0,089	0,835	-	-	-	-
FEPM	303	35	0,117	0,959	399	54	0,136	0,803	-	-	-	-
FBPM	-	-	-	-	-	-	-	-	201	27	0,135	0,940

FBC - Factor de bioconcentração que corresponde a K_a / K_d

Contrariamente ao observado na exposição individual ao Cu ($50 \mu\text{g l}^{-1}$), em que todos os tecidos atingiram um estado de equilíbrio (Capítulo IV – secção 3.4.2.1), na exposição à mistura metálica só nas brânquias foi atingindo um patamar na concentração de Cu, com um factor de bioconcentração (FBC) superior comparativamente com o do Cd, apesar das taxas de assimilação (K_a) e de eliminação (K_e) terem sido inferiores (Tabelas 6.2 e 6.4).

Nas diferentes fracções subcelulares observou-se um comportamento diferente. Nas brânquias e na glândula digestiva foi atingindo um estado estacionário nos teores de Cu nas fracções FI e FEPM, sendo este comportamento semelhante ao observado na exposição individual (Capítulo IV – secção 3.4.2.1). Enquanto, que a restante parte edível foi o único tecido no qual a concentração de Cu atinge um estado estacionário na fracção FBPM, sendo este comportamento distinto do observado na exposição individual (Tabela 6.4).

6.3.1.3. Concentração de Zn

A concentração (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias, encontra-se na Tabela 6.5. Os valores da concentração de Zn obtidos durante todo o ensaio laboratorial encontram-se em anexo (Tabela A.12 em Anexo).

Tabela 6.5 - Concentração de Zn (nmol g^{-1}) (total e nas diferentes frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte do corpo das amêijoas não contaminadas e expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) ao fim de 25 dias.

		Controlo	Mistura metálica
Brânquias	Total	1750 ± 264	1680 ± 150
	FI	1319 ± 220 (53)	496 ± 53 (20)
	FEPm	658 ± 57 (26)	1147 ± 107 (46)
	FBPM	513 ± 183 (21)	837 ± 10 (34)
Gl. digestiva	Total	1908 ± 377	3166 ± 306
	FI	1384 ± 303 (47)	2606 ± 274 (49)
	FEPm	990 ± 307 (34)	1397 ± 159 (27)
	FBPM	562 ± 125 (19)	1236 ± 127 (24)
Resto	Total	930 ± 138	1122 ± 121
	FI	490 ± 146 (43)	1014 ± 95 (41)
	FEPm	456 ± 126 (40)	781 ± 77 (32)
	FBPM	197 ± 45 (17)	673 ± 70 (27)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de Zn em cada uma das frações subcelulares.

VI

Os teores de Zn nos três tecidos das amêijoas não contaminadas apresentaram uma tendência decrescente durante o ensaio laboratorial, no entanto essa tendência não foi significativa ($p > 0,05$). Tal como já tinha sido referido no Capítulo V (secção 5.3.1), a glândula digestiva foi o tecido com teores mais elevados de Zn, seguido pelas brânquias e por último a restante parte edível, sem no entanto existirem diferenças significativas nos teores deste elemento na glândula digestiva e nas brânquias ($p > 0,05$) (Tabela 6.5). Tal como referido no Capítulo V (secção 5.3.1), os teores de Zn foram mais elevados na fração insolúvel (FI) seguidos pela fração FEPm e por último da fração FBPM, em todos os tecidos (Tabela 6.5).

Na Figura 6.5 encontra-se a evolução da concentração de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, na glândula digestiva e na restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica, durante 25 dias.

Contrariamente ao observado na acumulação de Cd e de Cu, onde os teores destes elementos foram acumulados pelos diferentes tecidos de *R. decussatus*, os teores de Zn variaram ao longo do tempo de exposição sem apresentarem um padrão de variação definido (Figura 6.5).

A concentração total de Zn nas brânquias das amêijoas expostas à mistura metálica (Figura 6.5-A), manteve-se constante nos primeiros 7 dias de exposição ($p > 0,05$), após este período os teores deste elemento aumentaram significativamente no 14º dia, decrescendo posteriormente até ao final do ensaio ($p < 0,05$), atingindo no último dia de exposição uma concentração de Zn inferior à observada no controlo (1680 ± 150 nmol g⁻¹). Os teores de Zn na fração subcelular FBPM apresentou a mesma tendência que no total, enquanto que na fração FI a concentração deste elemento apresentou uma tendência decrescente durante todo o ensaio. Por outro lado, os teores de Zn na fração FEPM decresceram nos primeiros 14 dias de exposição aumentando posteriormente até ao final do ensaio (Figura 6.5-A). Este comportamento, foi mais semelhante ao observado na exposição individual com 100 µg Zn l⁻¹, em que, apesar dos níveis deste metal não terem oscilado tão acentuadamente, não foi observado um aumento contínuo de Zn neste tecido, contrariamente ao observado com a exposição a 1000 µg Zn l⁻¹, na qual a concentração de Zn aumentou exponencialmente até ao final do período de exposição (Capítulo V - secção 5.3.1). Por outro lado, tal como observado na exposição individual com 100 µg Zn l⁻¹, os teores de Zn nas frações subcelulares variaram durante todo o período de exposição, mostrando existir remobilização de Zn entre as diferentes frações (Figura 6.5A e Capítulo V - secção 5.3.1).

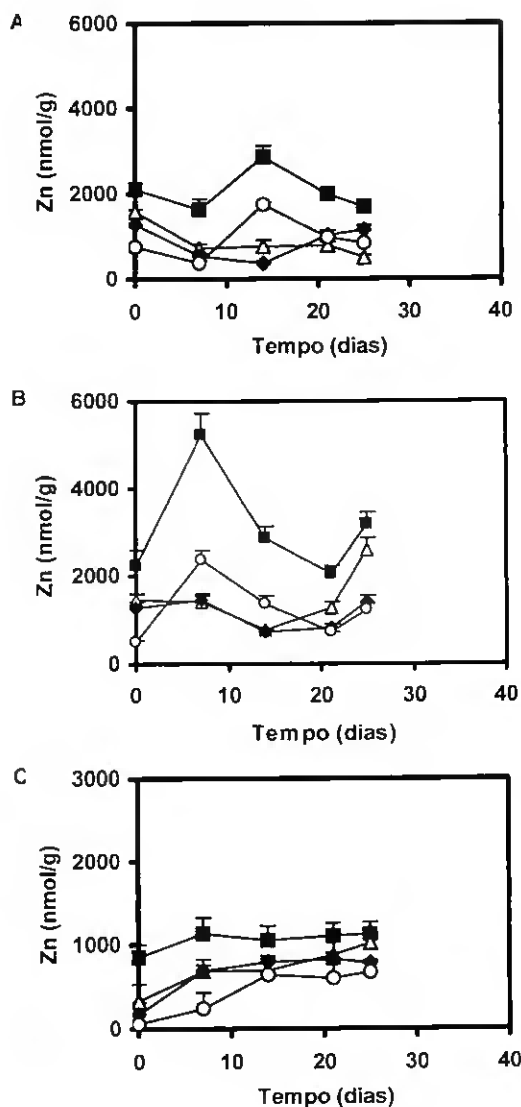


Figura 6.5 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn total e nas diferentes frações subcelulares nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias de exposição. (■ Total; Δ FI; ◆ FEPM; ○ FBPM).

Os teores de Zn (total e frações subcelulares) na glândula digestiva durante o período de exposição, apresentaram um comportamento distinto do observado nas brânquias (Figura 6.5-B). Os teores totais deste elemento aumentaram significativamente nos primeiros 7 dias de exposição ($p < 0,05$), decrescendo

posteriormente até ao 21º dia e voltando a aumentar no último dia de exposição (25º dia). Tal como nas brânquias, os teores de Zn na fracção FBPM apresentaram a mesma tendência que o total do tecido, embora no início fosse a fracção com teores mais baixos deste metal. Enquanto que nas fracções FI e FEPM os teores de Zn eram idênticos e diminuíram significativamente nos primeiros 14 dias de exposição aumentando posteriormente até ao final do ensaio, sendo os teores na fracção FI significativamente superiores aos da FEPM ($p < 0,05$) (Figura 6.5-B). Tal como observado nas brânquias, a variação da concentração de Zn na glândula digestiva das amêijoas expostas à mistura metálica foi semelhante à observada na exposição individual com $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ e distinta da de $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ (Figura 6.5B e Capítulo V - secção 5.3.1).

Na restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica (Figura 6.5-C), a concentração de Zn, apesar de ter aumentando nos primeiros 7 dias de exposição, não variou significativamente durante o restante período de exposição ($p < 0,05$). Nas fracções subcelulares a concentração de Zn apresentou um comportamento diferente em cada uma das diferentes fracções (Figura 6.5-C). Assim na fracção FI, os teores de Zn aumentaram linearmente durante todo o período de exposição, com uma velocidade de acumulação de $24,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($r = 0,959$; $p < 0,05$), enquanto que na fracção subcelular FBPM os teores de Zn aumentaram significativamente nos primeiros 14 dias de exposição ($p < 0,05$) e entre o 14 e 25º dia não foram observadas diferenças significativas na concentração deste elemento ($p < 0,05$). Na fracção FEPM a concentração de Zn apresentou a mesma tendência que o total do tecido (Figura 6.5-C). Tal como nos tecidos anteriores, a variação da concentração de Zn na restante parte edível das amêijoas expostas à mistura metálica foi semelhante à observada na exposição individual com $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ e distinta da de $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ (Figura 6.5C e Capítulo V - secção 5.3.1).

No final do período de exposição à mistura metálica, os teores de Zn nos três tecidos das amêijoas não foram significativamente diferentes do controlo, à excepção da glândula digestiva ($p < 0,05$), tendo aumentado em relação ao controlo cerca de 1,7 vezes ao fim de 25 dias (Tabela 6.5). O mesmo não se observou nos tecidos das amêijoas expostas a 100 e a $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, em que, ao fim de 40 dias de exposição os

teores de Zn foram significativamente superiores aos das amêijoas não contaminadas ($p < 0,05$) (Capítulo V - secção 5.3.1).

A distribuição subcelular de Zn nas brânquias das amêijoas expostas à mistura metálica no final do período de exposição foi distinta da observada nas amêijoas não contaminadas (a percentagem de Zn nas fracções FEPM e FBPM aumentaram significativamente e na fracção FI decresceu ($p < 0,05$)), observando-se a seguinte distribuição: FEPM > FBPM > FI (Tabela 6.5). Na glândula digestiva e na restante parte edível, apesar da quantidade de Zn associada à fracção FBPM ter aumentado significativamente e diminuído na fracção FEPM ($p < 0,05$), o padrão de distribuição de Zn foi semelhante ao amêijoas não contaminadas (FI > FEPM > FBPM) (Tabela 6.5). Também na exposição individual com $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, a distribuição subcelular de Zn não sofreu alterações relativamente ao controlo (FI > FEPM > FBPM), todos os tecidos (Capítulo V - secção 5.3.1).

6.3.2. CONCENTRAÇÃO DE MT NOS TECIDOS DE *R. decussatus*

A concentração de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas não contaminadas e expostas à mistura metálica durante 25 dias, encontra-se na Figura 6.6. Os valores da concentração de MT obtidos durante o ensaio laboratorial encontram-se em anexo (Tabela A.13 em Anexo).

Os teores médios ($\pm \sigma$) de MT nos três tecidos das amêijoas não contaminadas ($355 \pm 65 \text{ nmol g}^{-1}$ nas brânquias, $687 \pm 96 \text{ nmol g}^{-1}$ na glândula digestiva e $295 \pm 41 \text{ nmol g}^{-1}$ na restante parte edível) não variaram significativamente durante o ensaio experimental ($p < 0,05$). Tal como referido nos capítulos anteriores (Capítulos III, IV e V), a glândula digestiva corresponde ao tecido que apresenta teores desta proteína mais elevados, sendo significativamente superiores aos registados nas brânquias e na restante parte edível, entre os quais não existem diferenças significativas entre os teores de MT ($p < 0,05$).

6.3.2.1. Indução de MT

Os teores de MT nos três tecidos das amêijoas expostas à mistura metálica (Figura 6.6) aumentaram linearmente ($p < 0,05$) durante os primeiros 21 dias de exposição. Sendo a velocidade de indução de MT na glândula digestiva significativamente superior ($71,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r = 0,997$; $p < 0,05$) à observada nas brânquias ($30,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r = 0,941$; $p < 0,05$) e na restante parte edível ($25,0 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $r = 0,948$; $p < 0,05$). Após o aumento linear, os teores de MT atingiram uma fase estacionária, com concentrações médias de $979 \pm 32 \text{ nmol g}^{-1}$ nas brânquias, de $2278 \pm 241 \text{ nmol g}^{-1}$ na glândula digestiva e de $865 \pm 24 \text{ nmol g}^{-1}$ na restante parte edível. Ao fim de 25 dias de exposição à mistura metálica, os teores de MT nos tecidos das amêijoas contaminadas foram aproximadamente 3 vezes superiores aos teores de MT nos mesmos tecidos das amêijoas não contaminadas.

Também nas exposições individuais com Cd (4 e $40 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) (Capítulo III – secção 3.3.2.1), os teores de MT nos tecidos desta amêijoia aumentaram linearmente durante os primeiros 21 dias de exposição, com velocidades de indução significativamente inferiores às observadas na exposição à mistura metálica ($p < 0,05$). Após este período os teores de MT também atingiram uma fase estacionária. O mesmo comportamento foi observado nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas expostas individualmente a $50 \text{ } \mu\text{g Cu l}^{-1}$ (Capítulo IV – secção 4.3.3.1), com velocidades de indução também significativamente inferiores ($p < 0,05$), por outro na glândula digestiva dos teores desta proteína aumentaram exponencialmente. Contrariamente, na exposição individual com a concentração mais baixa de Zn ($100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) (Capítulo V – secção 5.3.2.1), os teores de MT no final do período de exposição não foram significativamente diferentes dos das amêijoas não contaminadas.

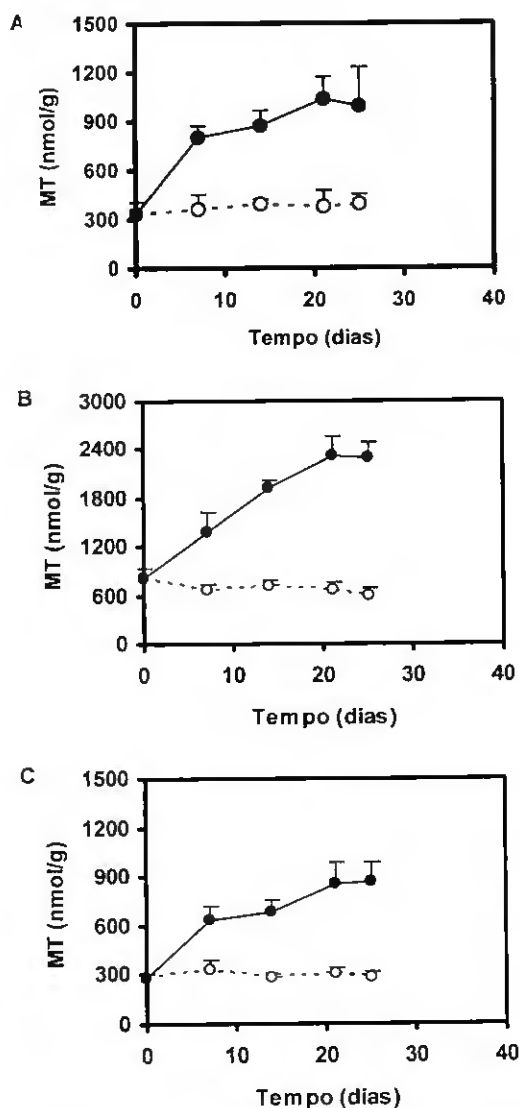


Figura 6.6 - Concentração (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias (A), glândula digestiva (B) e restante parte edível (C), em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias de exposição. (○ controle; ● exposição).

6.3.3. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE METAIS

A relação entre a concentração de MT e a concentração de cada metal (total e na fracção FBPM) nos três tecidos em estudo, encontra-se na Figura 6.7. Os níveis de MT aumentaram linearmente com o aumento das concentrações dos diferentes metais (total e fracção FBPM), à excepção da concentração de Zn que só se correlaciona significativamente no total da restante parte edível (Figura 6.7c). O incremento observado entre a concentração de MT e a de Cd e Cu foi significativamente superior na fracção subcelular FBPM comparativamente com o total do tecido ($p < 0,05$) (Figura 6.7 a-b). Nesta fracção subcelular foi aplicada uma análise de regressão múltipla para expressar a MT em função dos diferentes metais: MT (nmol g^{-1}) = f (Cd, Cu, Zn) (nmol g^{-1}) (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Concentração de MT em função do metal (nmol g^{-1}) na fracção subcelular de baixo peso molecular (FBPM), nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas (n=30).

Tecidos	Equação	r
Brânquias	MT = - 0,046 + 0,911 Cd - 0,063 Cu - 0,154 Zn ($p < 0,05$) ($p = 0,656$) ($p = 0,070$)	0,968
Gl. digestiva	MT = - 0,091 + 0,608 Cd + 0,350 Cu - 0,205 Zn ($p < 0,05$) ($p < 0,05$) ($p < 0,05$)	0,983
Restante parte edível	MT = 0,037 + 0,152 Cd + 0,876 Cu + 0,042 Zn ($p = 0,165$) ($p < 0,05$) ($p = 0,655$)	0,977

(nos parêntesis encontra-se o grau de significância da probabilidade baseada no t -teste)

Os resultados do modelo de regressão múltipla mostraram que a contribuição dos diferentes metais afectam de forma distinta os níveis de MT em cada um dos tecidos analisados (Tabela 6.6). Nas brânquias, apesar do ajuste linear entre as concentrações de MT e dos diferentes metais ser significativo para todos os metais (Figura 6.7), no modelo de regressão múltipla só o Cd contribuiu significativamente para a variação de MT. Por outro lado, na glândula digestiva todos os metais contribuíram significativamente para a variação desta proteína, embora o Zn se correlacione negativamente. Por último na restante parte edível só a concentração de Cu afectou significativamente os níveis de MTs (Tabela 6.6).

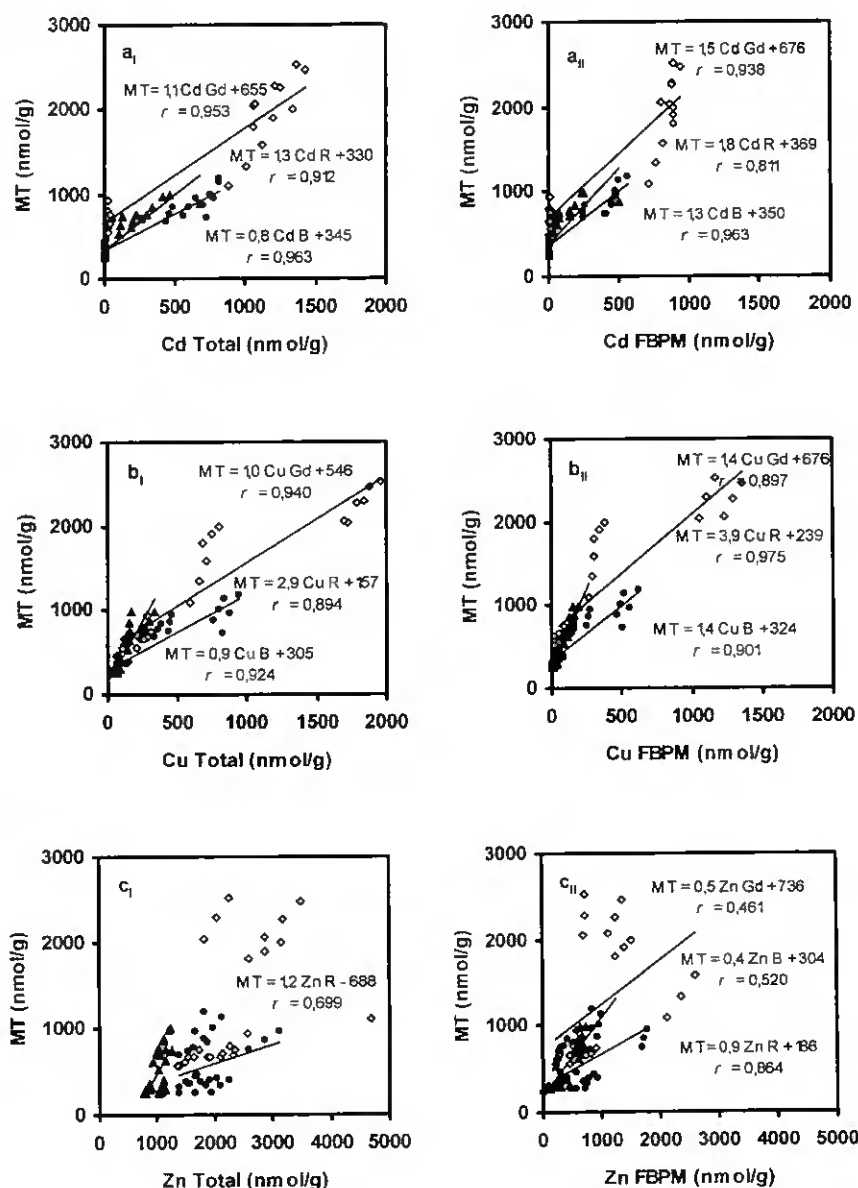


Figura 6.7 – Relação entre a concentração de MT e a concentração de metal no total e na fracção subcelular de baixo peso molecular (FBPM) nos diferentes tecidos da amêijoia: (a_I) Cd total; (a_{II}) Cd FBPM; (b_I) Cu total; (b_{II}) Cu FBPM; (c_I) Zn total; (c_{II}) Zn FBPM.

(●) B - brânquias; (○) Gd - glândula digestiva; (▲) R - restante parte edível.

A ligação dos metais à MT também pode ser observada através da razão molar entre a quantidade de proteína e de metais (MT:Metal). A comparação entre a razão molar de MT:Metal (Cd+Cu+Zn) ao longo do período de exposição nos diferentes tecidos de *R. decussatus* expostos à mistura metálica, encontram-se na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 – Razão molar MT:Metal em diferentes tecidos das amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias.

Dias	Brânquias	Glândula digestiva	Resto
0	1: 2,4	1: 0,8	1: 0,2
7	1: 1,0	1: 2,6	1: 0,7
14	1: 2,9	1: 1,4	1: 1,2
21	1: 2,0	1: 1,2	1: 1,1
25	1: 2,0	1: 1,5	1: 1,2

Apesar do aumento da concentração de MT ao longo do tempo de exposição nos três tecidos de *R. decussatus* (Figura 6.7), a razão molar MT:Metal não decresceu, mostrando que os metais se ligam a esta proteína (Tabela 6.7). No caso da ligação MT-Cd, a razão molar mostrou que, de uma maneira geral, a quantidade de Cd ligado a esta proteína aumentou no início da exposição, mantendo-se constante no restante período de tempo (1:0,5 nas brânquias, 1:0,4 na glândula digestiva e 1:0,2 na restante parte edível). Por outro lado, nas brânquias e na glândula digestiva a razão molar MT:Cu diminuiu ao longo de todo o ensaio, indicando que este elemento ligou-se progressivamente à MT. No final do período de exposição, o Cu ligado à MT foi superior à quantidade de Cd, nestes dois tecidos (1:0,6). Na restante parte edível a quantidade de Cu ligado a esta proteína aumentou nos primeiros 7 dias de exposição, mantendo-se constante no restante período de tempo. Por último, a razão molar MT:Zn nos três tecidos variou durante todo o período de exposição, mostrando que a ligação de Zn à MT é um processo dinâmico, o qual implica a substituição e redistribuição deste elemento.

6.4. DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios laboratoriais descritos anteriormente (Capítulos V, VI e VII) nos quais foi avaliado separadamente o efeito da exposição a Cd, Cu e Zn na indução da MT, mostraram que qualquer destes metais apresenta a capacidade de induzir esta proteína nos tecidos da amêijoia *R. decussatus*, dependendo da concentração e do tempo de exposição. No entanto, a relação entre a concentração de um metal e a resposta da MT não é necessariamente a prova da causa-efeito. De facto, quando ocorrem múltiplos contaminantes no meio, continua a persistir a questão de como os metais interactivam entre si e consequentemente qual a resposta da MT nestas condições.

Com o objectivo de fazer uma análise comparativa entre a resposta da MT nos diferentes tecidos da amêijoia exposta individual e simultaneamente a Cd, Cu e Zn, serão utilizados dados obtidos em estudos anteriores (Bebianno & Serafim, 1998; Serafim, 1993), nos quais esta espécie foi exposta individualmente a estes metais na mesma concentração que a mistura metálica empregue neste Capítulo.

O efeito da exposição polimetálica comparativamente com a exposição isolada de cada metal foi distinto, tendo sido observadas algumas diferenças na acumulação destes metais na exposição polimetálica comparativamente com a exposição individual a cada um destes metais.

Nas brânquias de *R. decussatus* a taxa de acumulação de Cd não foi significativamente diferente entre as amêijoas expostas separadamente a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Bebianno & Serafim, 1998) ou à mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 50 \mu\text{g Zn l}^{-1}$). Resultados semelhantes foram obtidos na ostra *C. virginica* exposta a $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ e à mistura de Cd ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) e Cu ($25 \mu\text{g l}^{-1}$) durante 28 dias, em que as taxas de acumulação deste metal foram semelhantes em ambas as exposições (Engel, 1999).

Contudo, quando comparados os coeficientes cinéticos determinados através do ajuste do modelo cinético de 1ª ordem, verificou-se que as taxas de assimilação e de eliminação de Cd nas brânquias desta amêijoia ($K_a = 103 \text{ d}^{-1}$ e $K_e = 0,11 \text{ d}^{-1}$) na exposição simultânea ao Cd, Cu e Zn foram superiores (cerca do dobro) às

determinadas para a exposição individual de Cd (Bebianno & Serafim, 1998). Mostrando que, a presença de Cu e Zn influenciam a incorporação e a eliminação de Cd neste tecido, em que existe uma maior incorporação e também maior eliminação deste metal, por competição pelos ligandos celulares disponíveis. Resultando no caso da mistura metálica num FBC (936) inferior comparativamente com o determinado na exposição individual (FBC - 1250).

À semelhança do que aconteceu na exposição ao Cd, a taxa de acumulação de Cu no mesmo tecido não foi significativamente diferente entre as amêijoas expostas separadamente a $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (Capítulo IV) ou à mistura metálica. No entanto, e contrariamente à acumulação de Cd nas brânquias, os coeficientes cinéticos determinados através do ajuste do modelo cinético de 1ª ordem, mostraram que as taxas de assimilação e de eliminação de Cu ($K_a = 54 \text{ d}^{-1}$ e $K_e = 0,013 \text{ d}^{-1}$) na exposição simultânea aos diferentes metais foram inferiores comparativamente com os calculados para a exposição individual de Cu, mostrando que apesar deste tecido incorporar menos Cu, na presença de Cd e Zn, elimina também mais lentamente os teores deste elemento, resultando num FBC superior na exposição polimetálica (FBC - 4015) comparativamente ao determinado na exposição isolada (FBC - 1302).

Contrariamente ao efeito da mistura metálica na acumulação de Cd e Cu, a incorporação Zn nas brânquias comparativamente com a exposição individual a este metal (Serafim, 1993) não apresentou diferenças significativas.

Na glândula digestiva o padrão de acumulação de Cd na exposição à mistura metálica foi distinto do observado na exposição individual de Cd. No caso da mistura metálica, os teores de Cd são acumulados até atingir um equilíbrio, mostrando que existe saturação dos ligandos, contrariamente ao observado nas exposições isoladas de Cd (4, 40 e $100 \mu\text{g Cd l}^{-1}$) em que os teores deste metal são acumulados exponencialmente ao longo de todo o período de exposição (Capítulo III e Serafim, 1993). Por outro lado, o padrão de acumulação de Cu e Zn na exposição à mistura metálica foi semelhante ao observado na exposição individual a estes metais. Em ambas as exposições, os teores de Cu foram acumulados linearmente, com taxas de acumulação ligeiramente superiores na exposição a $50 \mu\text{g Cu l}^{-1}$, mas não significativamente diferentes ($p > 0,05$),

enquanto que os teores de Zn foram regulados nos dois tipos de exposição (singular/composta).

Na restante parte edível o padrão de acumulação destes metais também foi semelhante em ambos os tipos de exposição. Os teores de Cd e Cu foram acumulados linearmente e os de Zn variaram durante todo o período de exposição. No entanto, as taxas de acumulação de Cd e Cu na exposição polimetálica foram significativamente superiores comparativamente à exposição individual.

As diferenças observadas na acumulação de Cd, Cu e Zn nos diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus* exposta individualmente e simultaneamente a estes metais, provocam respostas distintas na indução de MT. A exposição simultânea de metais provoca uma maior indução desta proteína.

Estas diferenças devem-se principalmente à acumulação destes metais na fracção FBPM, na qual se encontra a MT. Apesar das semelhanças entre a acumulação de Cd nos diferentes tecidos da amêijoia exposta individual e simultaneamente à mesma concentração de Cd, verificou-se que a velocidade de acumulação deste metal na fracção FBPM, no início do período de exposição foi superior nos tecidos das amêijoas expostas à mistura metálica, mostrando que este metal é acumulado rapidamente e que se liga à MT, à qual apresenta grande afinidade para o Cd. Também a acumulação de Cu na fracção FBPM apresenta um comportamento semelhante, aumentando linearmente durante todo período de contaminação em ambas as exposições (singular/composta), embora na exposição à mistura metálica a velocidade de acumulação seja significativamente superior, indicando que a MT nesta fracção (presente e/ou induzida) encontra-se em quantidade suficiente para se ligar ao excesso de Cu. Por outro lado, a concentração de Zn nesta fracção mostrou sofrer mais oscilações na exposição à mistura metálica comparativamente com a exposição individual deste metal, evidenciando uma transferência dinâmica do Zn desta proteína para outros ligandos das outras fracções subcelulares.

Apesar de não ter sido utilizado um *design* experimental quantitativo, que permitisse classificar a acção dos metais como aditiva, mais que aditiva ou menos que aditiva (Altenburger *et al.*, 1993), este estudo aponta para um efeito sinérgico na indução

de MT na presença simultânea dos três metais. Os resultados sugerem que o Cd na presença dos outros metais é rapidamente acumulado, sendo inicialmente o principal indutor de MT, através da substituição do Zn. O Zn parece servir como elemento de renovação, proporcionando um aumento nos níveis de MT. Com o decorrer do tempo, o Cd é também substituído pelo Cu, o qual apresenta uma grande afinidade para esta proteína. A substituição de Cd por Cu na MT, foi também observada na reacção Cd-MT-2 (isolada a partir de fígado de coelho) com Cu(II), resultando $Cd_3Cu^I_5$ -MT. Nesta reacção o Cu(II) é reduzido a Cu(I) acompanhado pela oxidação dos grupos tiólicos da proteína (Vaher *et al.*, 2001). Similarmente, Yang *et al.* (2000) observaram a substituição de Cd por Cu no complexo Cd-MT, resultando num aumento de Cu na fracção que contém a MT, em fígado de ratos após 7 dias de terem sido injectados intraperitonealmente com 2 mg Kg⁻¹ de CdCl₂.

Resultados semelhantes foram obtidos por Engel (1999) na ostra *O. virginica*, em que observaram uma indução de MT distinta na exposição isolada ao Cd (100 µg l⁻¹) e ao Cu (25 µg l⁻¹) relativamente à combinação destes dois metais. Este estudo mostrou que os níveis de MT aumentaram para cerca do dobro ao fim de 28 dias de exposição à mistura de Cd e Cu, verificando que o Cu substitui o Cd na MT, mas o Cd não é eliminado do organismo. Também no fígado da truta *Salmo gairdneri* exposta simultaneamente ao Cd, Cu e Zn foi observado um aumento significativo dos níveis de MT ao fim de 4 semanas de exposição, comparativamente com a exposição individual de cada um destes metais, verificando-se um aumento de Cu associado à MT no final do período de exposição (Roch & McCarter, 1984).

No fígado da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta simultaneamente a Cd e a Zn (1,5 µg Cd l⁻¹ + 200 µg Zn l⁻¹ e 10 µg Cd l⁻¹ + 1000 µg Zn l⁻¹), o efeito da mistura deste dois metais na resposta da MT não corresponde à soma dos efeitos das exposições individuais de cada metal, sendo a resposta da MT dominada pelo efeito de Cd (Lange *et al.*, 2002). Por outro lado, no mesmo tecido desta espécie exposta a uma mistura de Cu e Zn (16 µg Cu l⁻¹ + 21 µg Zn l⁻¹ e 16 µg Cu l⁻¹ + 50 µg Zn l⁻¹) os teores de Cu aumentam significativamente na presença do Zn, no entanto não foram observadas diferenças nos níveis de MT (Dethloff *et al.*, 1999).

De uma forma geral podemos concluir que o efeito da exposição polimetálica nos diferentes tecidos de *R. decussatus* resulta numa maior indução de MT nos tecidos da amêijoia *R. decussatus*, em que o Cd é inicialmente o principal indutor de MT, através da substituição do Zn, no entanto com o decorrer do tempo este elemento é também substituído pelo Cu. Desta forma, a resposta da MT relativamente à concentração individual de cada um destes metais é distinta da observada na exposição à mistura metálica, devido à forma como os metais interactivam entre si, de acordo com a sua afinidade para esta proteína. Estes resultados têm implicações em estudos de campo, onde estes metais podem ocorrer simultaneamente.

Capítulo VII

VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS E METALOTIONINA NUMA POPULAÇÃO NATURAL DE AMÊIJOAS *Ruditapes decussatus*

Bebianno, M.J. & Serafim, M.A., 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 53-66.

7.1 INTRODUÇÃO

Os moluscos são sensíveis à presença de metais, por apresentarem uma capacidade reduzida para regular a concentração metálica nos seus tecidos. A distribuição interna de ligandos metálicos influencia parcialmente a cinética do balanço metálico entre acumulação e eliminação, sendo esperadas variações interespecíficas na concentração metálica. Ligandos capazes por desintoxicar os metais desempenham um papel crucial ao conferirem resistência aos metais acumulados. A indução de proteínas metálicas solúveis, como as metalotioninas (MTs), parece ser uma boa base para examinar as respostas dos organismos num ambiente natural (Langston *et al.*, 1998).

Trabalhos recentes sobre MT têm demonstrado, que estas proteínas de baixa massa molecular, estáveis ao calor e de natureza não enzimática, que existem no citoplasma e também no núcleo das células de moluscos marinhos, têm uma forte afinidade para se ligarem a cátions metálicos da classe *B*. Nestas espécies, a MT está envolvida na regulação celular e na desintoxicação de metais essenciais e não-essenciais. A introdução de metais nas células pode induzir a síntese destas proteínas e o aumento da quantidade de MT pode ser considerado uma resposta bioquímica à contaminação metálica. Combinando a determinação da concentração de MT com observações associadas a alterações na partição metálica nos tecidos dos moluscos, pode obter-se um conhecimento mais aprofundado sobre os processos de bioacumulação, transferência, armazenamento e eliminação dos diferentes metais (Langston *et al.*, 1998; Isani *et al.*, 2000; Cosson, 2000).

Desde a sua descoberta nas ostras (Casterline & Yip, 1975) e mexilhões (Noël-Lambot, 1976), a MT têm sido proposta como um biomarcador específico na detecção precoce de efeitos nocivos causados por contaminação metálica em populações naturais (Viarengo, 1989; Roesijadi, 1994a). A determinação da concentração de MT em mexilhões é um indicador útil sobre a contaminação por Cd, Hg e possivelmente Ag e Cu. Por esta razão, vários estudos sugerem que a determinação dos níveis de MT seja incorporada em esquemas de monitorização ambiental com o objectivo de prever, a nível molecular, alterações bioquímicas causadas por metais em traço antes de

serem observados efeitos toxicológicos (Langston *et al.*, 1998). No entanto, a concentração de MT é influenciada por vários factores bióticos e abióticos. Isto é especialmente relevante em estudos de campo, onde factores, como a estação do ano, o sexo e a idade/tamanho podem influenciar a concentração de MT. De facto, a concentração desta proteína em diferentes espécies de bivalves, nomeadamente *M. galloprovincialis* (Viarengo *et al.*, 1997), *C. gigas* (Cosson, 2000), *M. balthica* (Bordin *et al.*, 1997) e *C. fluminea* (Baudrimont *et al.*, 1997) mostraram uma importante variação sazonal na concentração de MT. O efeito da idade/tamanho na concentração de MT pode, no entanto, ser minimizado recolhendo organismos com o mesmo tamanho. O peso do organismo foi também considerado um factor biótico importante, uma vez que varia com a estação do ano, devido ao ciclo reprodutor e à disponibilidade de alimento. Desta forma, a regulação endógena de MT deve ser tomada em consideração antes da MT ser utilizada como um biomarcador de exposição metálica.

Para além da utilização da MT como biomarcador em populações naturais de mexilhão de água doce *P. grandis* (Wang *et al.*, 1999) e de ostra *C. virginica* (Roesijadi, 1994a) existem poucos exemplos de validação de MT em estudos de campo.

A amêijoia *R. decussatus* é um molusco suspensívoro, amplamente distribuído na zona costeira da Europa (do Reino Unido à Mauritânia) e do Mediterrâneo. Devido ao seu importante valor económico, esta espécie foi seleccionada para bioindicador de alterações metálicas ambientais. Em Portugal, a amêijoia *R. decussatus* é cultivada extensivamente na zona intertidal da Ria Formosa, um importante sistema lagunar da costa sul de Portugal, com uma área de 14522 ha classificada como Parque Nacional. O cultivo desta amêijoia é uma importante actividade económica para os habitantes da região, onde existem aproximadamente 1500 viveiros que ocupam um total de 1000 ha, produzindo 8000 ton por ano (equivalente a 70 milhões \$US/ano), 90% da qual é exportada. No entanto, nos últimos 10 anos, a produção desta espécie diminuiu como resultado da deterioração da qualidade da água da lagoa. Como consequência, a mortalidade de amêijoas aumentou, verificando-se em alguns locais específicos o desaparecimento total desta espécie. Os metais lançados no interior da lagoa através de efluentes domésticos não tratados, de unidades industriais e de

escorrências agrícolas, contribuíram para o declínio desta população de amêijoas e tornaram-se uma ameaça do ponto de vista ambiental (Bebianno, 1995).

A amêijoia *R. decussatus*, tal como outras espécies de moluscos, acumula elevadas concentrações de Cd e Cu sem efeitos nocivos aparentes (Henry *et al.*, 1984; Bebianno *et al.*, 1993; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995), reflectindo nos seus tecidos as concentrações desses metais no ambiente (Cortesão *et al.*, 1986; Bebianno, 1995). No entanto, a concentração de Zn parece ser regulada nesta espécie (Cortesão *et al.*, 1986, Bebianno *et al.*, 1994). Desta forma, a concentração de metais nos tecidos de *R. decussatus* depende de diferentes processos bioquímicos que ocorrem nas células.

O envolvimento de MT na tamponização intracelular de iões metálicos é evidente nesta espécie de molusco, exposta a Cd e Cu em ensaios laboratoriais (Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995). A MT foi induzida na parte edível total, brânquias, glândula digestiva e restantes tecidos da amêijoia *R. decussatus* após a exposição a metais essenciais (Cu) e não essenciais (Cd) (Bebianno *et al.*, 1993, Roméo & Gnassia-Barelli, 1995, Hamza-Chaffai *et al.*, 1998). A concentração de MT nas brânquias aumentou para o dobro após exposição a Cd (Bebianno *et al.*, 1993, 1994). Contudo, recorrendo a técnicas fluométricas Roméo & Gnassia-Barelli (1995), investigaram o potencial da indução de MT nas brânquias de *R. decussatus* para fins de monitorização e observaram uma fraca indução de MT após uma semana de exposição a $500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. Por outro lado, na glândula digestiva não se observou qualquer indução após cinco dias de exposição a Cu ($75 \mu\text{g l}^{-1}$) (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998), mas quando foram expostas a Cd ($100 \mu\text{g l}^{-1}$), os teores de MT neste tecido duplicaram (Bebianno *et al.*, 1993; 1994).

Por isso, este bivalve foi considerado um modelo muito interessante do ponto de vista económico e ecotoxicológico. No entanto, existe um número muito limitado de estudos sobre os níveis de MT em populações naturais de *R. decussatus* (Bebianno *et al.*, 1993; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999). O presente Capítulo descreve a variação da partição dos metais e da concentração de MT em *R. decussatus* recolhidas na Ria Formosa ao longo de um gradiente de concentração metálica. Embora o efeito do sexo possa influenciar as concentrações de MT, este efeito não foi considerado porque não

existem variações significativas das concentrações metálicas entre sexos nesta espécie (ver Capítulo II).

A dinâmica espacial e sazonal da distribuição da concentração total e subcelular (fracção insolúvel – FI, fracção solúvel de elevado peso molecular - FEPM e fracção solúvel de baixo peso molecular tratada termicamente - FBPM) de metais (Cd, Cu e Zn), juntamente com a dos níveis de MT foi estudada nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, durante um ano para avaliar a possibilidade de utilizar a MT como um biomarcador de exposição metálico, em diferentes tecidos nesta população natural de amêijoas.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amêijoas *R. decussatus* (comprimento da concha $36,0 \pm 0,1$ mm, peso seco médio $0,55 \pm 0,07$ g) foram recolhidas durante um ano (1994/95) na Primavera, Verão, Outono e Inverno, em diferentes locais da Ria Formosa, localizada na costa sul de Portugal (Figura 7.1). Os locais de amostragem foram seleccionados de acordo com um gradiente de concentração metálico (Bebiano, 1995).

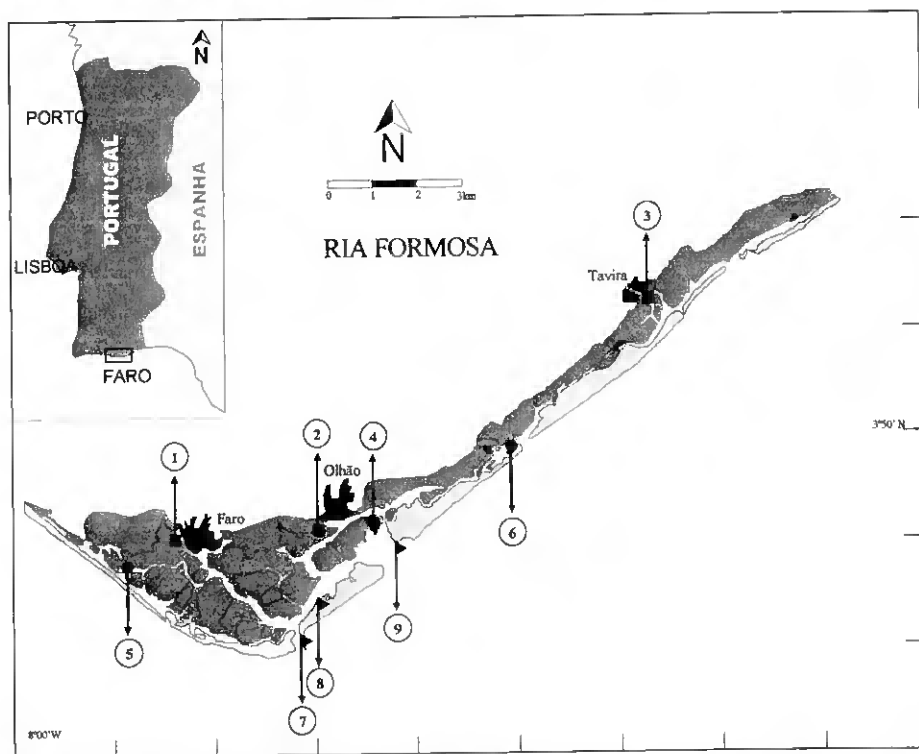


Figura 7.1 – Locais amostrados na Ria Formosa. 1) Faro; 2) Olhão; 3) Tavira; 4) Marim; 5) Ramalhete; 6) Torre d'Aires; 7) Farol; 8) Culatra; 9) Armona.

As amêijoas recolhidas nos diferentes locais foram transportadas para o laboratório, depuradas durante 24 horas, e dissecadas em brânquias, glândula digestiva e restante parte edível. Cada um dos tecidos foi pesado e o índice de condição (IC) calculado

através da razão: (peso seco do órgão/peso seco da concha) \times 100. Amostras compostas de seis tecidos foram usadas para determinar as concentrações de metais (Cd, Cu e Zn) e de MT, como descrito seguidamente.

Os tecidos foram homogeneizados em três volumes de tampão Tris-HCl 0,02M (pH 8,6), num banho de gelo (4°C). Subamostras de homogeneizado foram retiradas para a determinação da concentração total de metais e da razão peso fresco / peso seco de cada um dos tecidos. Outra aliquota de homogeneizado (3 ml) foi centrifugada a 30000 g durante 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado do resíduo (FI), tratado termicamente a 80°C durante 10 min e re-centrifugado nas mesmas condições para precipitar os ligandos de elevado peso molecular (FEPM) (como esquematizado na Figura 2.2 do Capítulo II – secção 2.2). A concentração de MT foi determinada no citosol tratado termicamente por polarografia diferencial com impulsos, como descrito por Bebianno & Langston (1989) e a concentração de metais foi determinada em todas as fracções subcelulares por espectrofotometria de absorção atómica, após digestão com ácido nítrico em forno de microondas (Capítulo II – secção 2.2).

As concentrações de MT e de metais estão expressas em nmol g⁻¹ de peso seco do tecido inicialmente homogeneizado. A qualidade dos resultados foi assegurada pela análise de metais ao TORT I de hepatopâncreas de lagosta (National Research Council Canada). Os dados obtidos (média \pm s.d.) foram 26,3 \pm 2,1 μ g g⁻¹ para o Cd, 449 \pm 0,04 μ g g⁻¹ para o Cu e 160 \pm 0,7 μ g g⁻¹ para o Zn comparado com os valores certificados de 26,98 \pm 0,01 μ g g⁻¹, 439 \pm 22 μ g g⁻¹ e 177 \pm 10 μ g g⁻¹, respectivamente.

7.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variação geográfica e sazonal da concentração de metais e de MT foi testada nos diferentes tecidos através análise de variâncias (ANOVA) com duas entradas, considerando o local e as estações do ano como variáveis independentes. Para discriminar as diferenças entre os locais e as estações do ano foi utilizado o teste de Duncan. A estes dados também foram aplicadas análises de regressão (linear e múltipla).

A análise de componentes principais (PCA) foi também utilizada para o agrupamento dos diferentes locais amostrados. Os dados foram normalizados de acordo com a seguinte expressão: $(x_1 - x_2)/s$, onde x_1 corresponde à média da concentração de cada metal e MT obtida em cada local; x_2 corresponde à média referente a todos os locais para cada metal e MT e s corresponde ao desvio padrão relativo à média x_2 .

Com o objectivo de expressar a MT (variável dependente) em função da concentração de metal e peso dos organismos (variáveis independentes), as variáveis independentes foram padronizadas para evitar a diferença das unidades de acordo com a seguinte equação:

$$X_i = (x_i - (x_{i \max} + x_{i \min})/2) / ((x_{i \max} - x_{i \min})/2)$$

Onde, $X_i = +1$ para o valor máximo da variável e $X_i = -1$ para valor mínimo. $x_{i \min}$ corresponde ao valor mais baixo de cada variável e $x_{i \max}$ ao valor mais elevado.

Todos os testes foram efectuados utilizando um nível de significância de 0,05.

7.3. RESULTADOS

Na Figura 7.2 encontram-se os resultados da análise de PCA com todos os dados de metais e de MT dos diferentes locais apresentados na Figura 7.1. Os dois primeiros eixos (PC1 e PC2) explicam cerca de 96% da variação total: a primeira componente (PC1) representa 66,1% da variação total, enquanto a PC2 somente 29,9%.

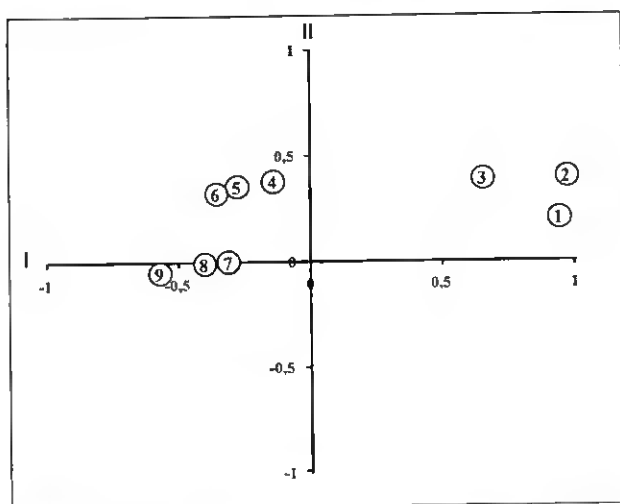


Figura 7.2 – Análise de componentes principais (PCA), em função da concentração de metais e de MT na amêijoia *R. decussatus*.

A análise de agrupamento mostrou que os locais amostrados estão agrupados em três zonas diferentes: zona A - locais próximos dos centros urbanos (locais 1-3); zona B - locais na zona intermédia da Ria Formosa (locais 4-6) e zona C - locais influenciados pela entrada de água do oceano (locais 7-9) (Figura 7.2). Assim, os resultados da variação espacial e sazonal da concentração de metais e de MT foram analisados considerando estas três zonas distintas (A, B e C).

7.3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS METAIS PELOS DIFERENTES TECIDOS

A concentração total de Cd, Cu e Zn nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas *R. decussatus*, recolhidas nas três zonas da Ria Formosa,

durante um período de um ano, encontra-se nas Figuras 7.3-7.5 e Tabelas 7.1-7.3, respectivamente.

A concentração mais elevada de Cd foi detectada na glândula digestiva e a mais baixa na restante parte edível (Figura 7.3). Desta forma, a concentração total de Cd decresceu de acordo com a seguinte sequência: glândula digestiva > brânquias > restante parte edível, sendo a concentração deste metal significativamente diferente entre cada um dos tecidos ($p < 0,05$).

A distribuição da concentração total de Cu entre os três tecidos foi relativamente semelhante à do Cd (Figura 7.4). A concentração de Cu decresceu na seguinte ordem: glândula digestiva \approx brânquias > restante parte edível. Não foram observadas diferenças significativas entre a concentração de Cu na glândula digestiva e nas brânquias ($p > 0,05$), no entanto os níveis de Cu nestes dois tecidos foram significativamente superiores aos observados na restante parte edível ($p < 0,05$).

O padrão de distribuição da concentração de Zn foi, contudo, diferente da dos outros dois metais (Figura 7.4). A concentração mais elevada de Zn foi detectada nas brânquias, seguida da glândula digestiva e por último da restante parte edível. A concentração de Zn foi significativamente diferente entre cada um dos tecidos analisados ($p < 0,05$).

7.3.1.1. Variação espacial e sazonal

A variação espacial da concentração de Cd nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível mostrou que a concentração de Cd é dependente da zona considerada (Figura 7.3 e Tabela 7.1). A concentração de Cd mais elevada ocorreu na zona A para todos os tecidos ($13,6 \pm 4,8$ nmol g⁻¹ nas brânquias, $22,7 \pm 7,6$ nmol g⁻¹ na glândula digestiva e $7,2 \pm 2,2$ nmol g⁻¹ na restante parte edível) (Figura 7.3A e Tabela 7.1) e foi significativamente diferente das outras duas zonas ($p < 0,05$).

A distribuição espacial de Cu mostrou que as concentrações mais elevadas deste metal ocorreram nas zonas A e B, para todos os tecidos (Figura 7.4). Ao contrário do que

aconteceu para o Cd, a concentração de Cu nas três zonas não foi significativamente diferente ($p > 0,05$).

A concentração de Zn, contrariamente à dos outros metais, não apresentou qualquer variação espacial significativa ($p > 0,05$).

A variação sazonal dos três metais também mostrou um padrão diferente. A variação sazonal da concentração de Cd na glândula digestiva foi significativamente mais elevada no Verão e no Inverno na zona A, enquanto que nas brânquias e restante parte edível não houve diferenças significativas entre as estações ($p > 0,05$) (Figura 7.3A). Nas outras duas zonas, o padrão sazonal nos diferentes tecidos foi semelhante ao da zona A, embora a concentração de Cd seja menor (Figura 7.3B-C).

Relativamente ao Cu, não foram detetadas diferenças sazonais significativas entre os tecidos para na zona A (Figura 7.4A). Na zona B, apenas a concentração de Cu nas brânquias foi significativamente superior no Verão e no Inverno quando comparada com a Primavera e o Outono (Figura 7.4B). Na zona C, com excepção da glândula digestiva (onde se verificou a existência de diferenças significativas na concentração de Cu entre Verão e Outono), não houve variações significativas nos outros dois tecidos ($p > 0,05$) (Figura 7.4C).

Para o Zn, com a excepção das brânquias na zona B (onde as concentrações de Zn no Inverno foram significativamente superiores quando comparadas com as outras estações – Figura 7.4B) e da glândula digestiva na zona C (onde as concentrações de Zn no Verão foram significativamente superiores quando comparadas com as outras estações – Figura 7.4C) ($p > 0,05$), não ocorreram diferenças significativas entre as estações do ano ($p > 0,05$).

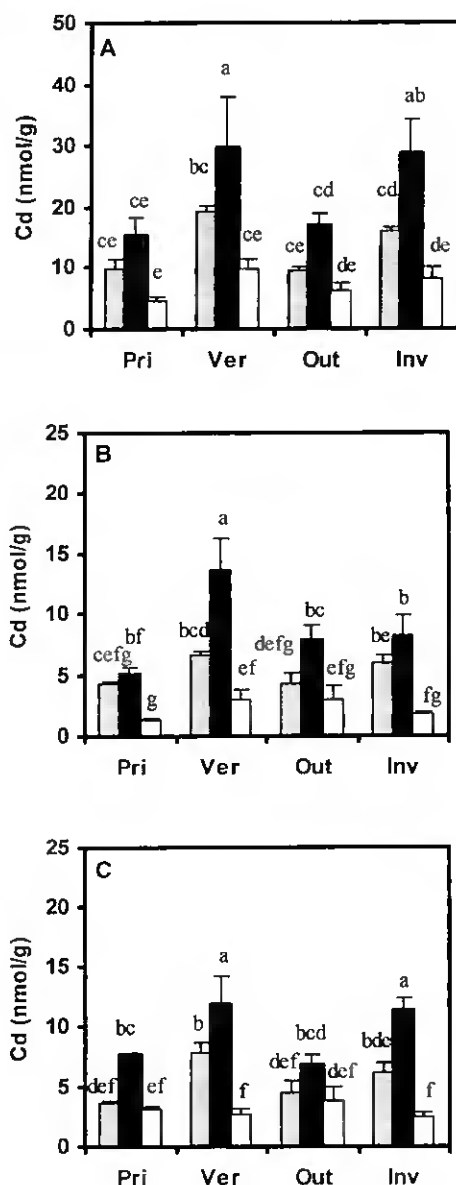


Figura 7.3 – Variação sazonal da concentração de Cd (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A (A), B (B) e C (C) da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)).

□ Brânquias ■ GL Digestiva □ Resto

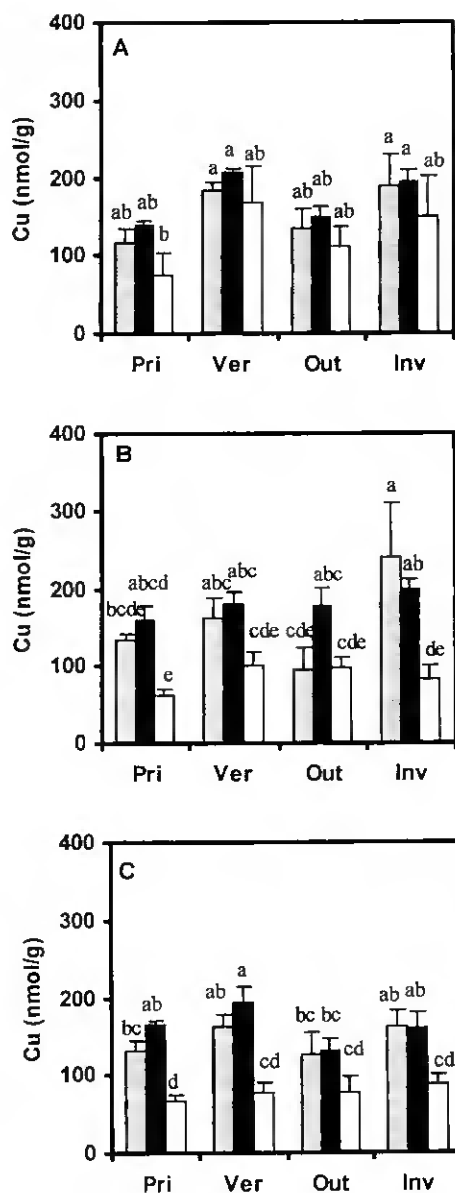


Figura 7.4 – Variação sazonal da concentração de Cu (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A (A), B (B) e C (C) da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)).

□ Brânquias ■ Gl. Digestiva □ Resto

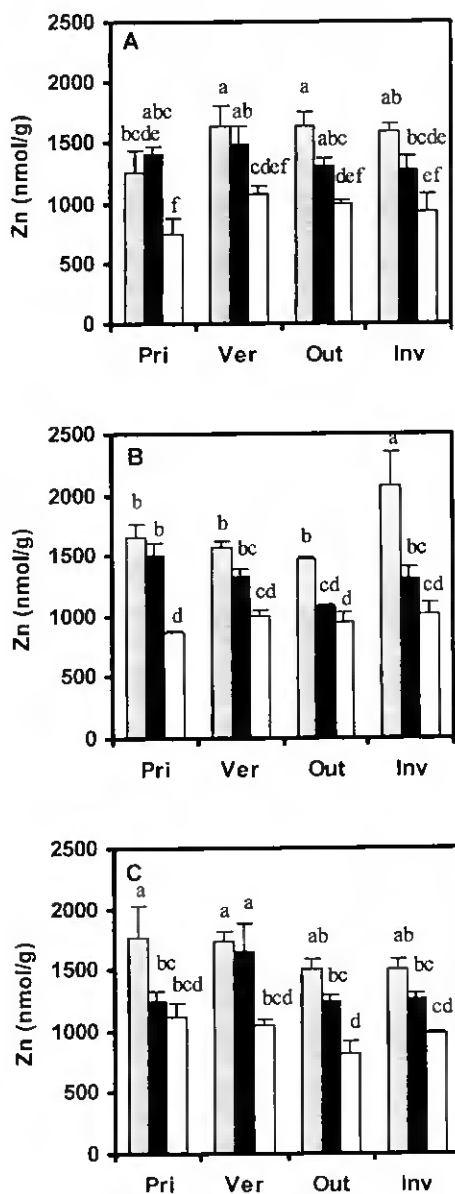


Figura 7.5 - Variação sazonal da concentração de Zn (média \pm σ) nas brànquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A (A), B (B) e C (C) da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)).

□ Brànquias ■ GL. Digestiva □ Resto

7.3.2. DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DE METAIS

A distribuição subcelular de Cd, Cu e Zn nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível de *R. decussatus* recolhidas nas três zonas da Ria Formosa encontra-se nas Tabelas 7.1-7.3, respectivamente.

A maior percentagem de Cd (>50%) foi, em todos os tecidos, na fracção FBPM onde está maioritariamente ligado à MT, seguida pela fracção insolúvel (FI) (>20%) e as proteínas de elevado peso molecular (FEPM) (\cong 13%) (Tabela 7.1). Esta distribuição subcelular não foi significativamente diferente entre tecidos ($p > 0,05$), excepto para a zona C, onde a percentagem de Cd nas fracções FI e FBPM foi significativamente diferente na glândula digestiva e restante parte edível ($p < 0,05$).

A distribuição subcelular de Cd em todos os tecidos, seguiu o mesmo padrão da variação da espacial da concentração total de Cd, sendo dependente da zona. Nos três tecidos, o Cd ligado à fracção solúvel (FBPM e FEPM) e insolúvel (FI) foi significativamente superior na zona A, quando comparado com as outras duas zonas (B e C) ($p < 0,05$). Similarmente, na fracção solúvel, o Cd ligado à fracção que contém a MT (FBPM) (>65% do total de Cd) foi também significativamente superior na zona A ($p < 0,05$), enquanto que a percentagem de Cd ligado à fracção FEPM (>13%) não apresentou qualquer variação espacial.

Tal como para a concentração de Cd total, a percentagem de Cd ligado à MT (FBPM) mostrou alguma variabilidade sazonal, aumentando no Verão (76%) e no Inverno (71%) na zona A. Por isso ocorreu uma alteração na razão solúvel / insolúvel somente devido a um aumento do Cd na fracção FBPM, provavelmente ligado à MT. Um padrão sazonal semelhante foi encontrado para a distribuição subcelular de Cd nas zonas B e C para as brânquias e glândula digestiva, tendo sido menos evidente na restante parte edível (Tabela 7.1).

A distribuição subcelular de Cu nos três tecidos de *R. decussatus* foi semelhante à do Cd (Tabela 7.2). A maior percentagem deste metal (60 a 70% do total de Cu acumulado) encontra-se associada à fracção solúvel (FEPM e FBPM), em todos os tecidos. Nesta fracção a concentração de Cu mais elevada encontra-se associada à fracção FBPM (\cong 50%), embora em percentagem significativamente inferior que a do

Cd. No entanto, ao contrário do Cd uma quantidade importante de Cu está presente na fracção insolúvel ($\cong 35\%$). Também contrariamente ao observado com o Cd, a distribuição subcelular de Cu foi semelhante em todos os tecidos, zonas e estações do ano.

A distribuição subcelular de Zn nos três tecidos de *R. decussatus* foi diferente da dos outros dois metais, sendo oposta à do Cd (Tabela 7.3). A concentração mais elevada de Zn foi detectada na fracção FI, sendo dependente do tecido ($>60\%$ nas brânquias, $>45\%$ na glândula digestiva e $>50\%$ na restante parte edível), seguida da fracção proteica FEPM ($>20\%$). Somente uma pequena percentagem de Zn está ligada à fracção que contém a MT ($>15\%$).

Ao contrário do verificado para o Cd, não foram observadas diferenças significativas na distribuição de Zn entre zonas ($p>0,05$). No entanto, foram detectadas diferenças significativas na concentração de Zn nas fracções FI e FEPM, entre as brânquias e a glândula digestiva, mas na fracção FBPM a percentagem de Zn foi semelhante entre os três tecidos (Tabela 7.3). Tal como para o Cu, não foram observadas diferenças significativas na distribuição subcelular de Zn para a maior parte dos locais e das estações do ano, com a excepção da zona A, para as brânquias e glândula digestiva. Nestes dois tecidos a percentagem de Zn ligado à fracção citosólica diminuiu (de 13 para 11% nas brânquias e de 19 para 11% na glândula digestiva) do Verão para o Inverno. Assim, embora a concentração de Cd tenha aumentado na fracção citosólica a concentração de Zn ligado à MT diminuiu ligeiramente, o que conduziu à modificação da razão solúvel / insolúvel de Zn nas brânquias e na glândula digestiva. Assim, enquanto o Cd ligado à MT aumenta, o Zn é removido e redistribuído pelos outros dois componentes subcelulares, uma vez que a concentração total de Zn não se alterou.

Tabela 7.1 – Concentração de Cd (total e subcelular) (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes zonas da Ria Formosa.

		Total (nmol g ⁻¹ peso seco)	FI (nmol g ⁻¹ peso seco)	FEPM (nmol g ⁻¹ peso seco)	FBPM (nmol g ⁻¹ peso seco)	
Brânquias	Zona A	Pri	9,86 ± 1,67	2,06 ± 1,26	1,29 ± 0,27	5,92 ± 0,26
		Ver	19,27 ± 0,88	3,48 ± 0,95	2,53 ± 0,70	15,85 ± 0,80
		Out	9,33 ± 0,68	2,23 ± 0,16	1,61 ± 0,42	6,50 ± 0,88
		Inv	16,02 ± 0,75	3,55 ± 1,26	1,38 ± 0,48	12,43 ± 0,35
		média	13,62 ± 4,84	2,67 ± 1,23 (20%)	1,20 ± 1,00 (12%)	8,93 ± 3,76 (68%)
	Zona B	Pri	4,34 ± 0,11	1,28 ± 0,20	0,30 ± 0,03	1,44 ± 0,41
		Ver	6,64 ± 0,23	1,14 ± 0,49	0,95 ± 0,06	3,34 ± 0,61
		Out	4,21 ± 0,82	0,85 ± 0,25	0,56 ± 0,26	2,22 ± 0,21
		Inv	5,98 ± 0,68	1,60 ± 0,12	0,92 ± 0,47	4,01 ± 0,28
		média	5,29 ± 1,21	1,22 ± 0,31 (28%)	0,68 ± 0,31 (14%)	2,75 ± 1,15 (58%)
	Zona C	Pri	3,65 ± 0,20	0,74 ± 0,09	0,21 ± 0,05	1,60 ± 0,35
		Ver	7,86 ± 0,77	1,63 ± 0,54	1,07 ± 0,23	3,95 ± 0,29
		Out	4,50 ± 0,98	1,00 ± 0,24	0,43 ± 0,21	2,00 ± 0,08
		Inv	6,18 ± 0,85	2,36 ± 0,47	0,76 ± 0,21	3,98 ± 0,40
		média	5,55 ± 1,86	1,43 ± 0,72 (29%)	0,62 ± 0,38 (12%)	2,88 ± 1,26 (59%)
Glândula digestiva	Zona A	Pri	15,26 ± 2,90	3,34 ± 0,47	1,66 ± 0,50	9,93 ± 2,33
		Ver	29,76 ± 8,28	6,51 ± 1,18	3,47 ± 1,44	20,38 ± 1,50
		Out	16,94 ± 1,99	4,11 ± 1,05	1,81 ± 0,83	11,10 ± 1,31
		Inv	28,71 ± 5,63	6,00 ± 1,55	2,78 ± 0,99	19,15 ± 2,84
		média	22,67 ± 7,63	4,49 ± 2,07 (22%)	2,43 ± 0,85 (11%)	14,39 ± 4,03 (67%)
	Zona B	Pri	5,16 ± 0,49	2,51 ± 0,81	1,27 ± 0,30	3,27 ± 0,79
		Ver	13,62 ± 2,61	3,23 ± 0,87	2,56 ± 0,34	7,98 ± 0,84
		Out	7,84 ± 1,29	2,40 ± 1,51	1,12 ± 0,03	5,06 ± 0,87
		Inv	8,30 ± 1,64	2,60 ± 0,55	1,60 ± 0,63	6,42 ± 1,45
		média	8,73 ± 3,54	2,68 ± 0,37 (28%)	1,39 ± 1,01 (16%)	5,68 ± 2,00 (56%)
	Zona C	Pri	7,61 ± 0,28	1,73 ± 0,69	1,17 ± 0,43	3,62 ± 0,35
		Ver	11,77 ± 2,44	2,24 ± 0,55	1,86 ± 0,36	7,54 ± 0,61
		Out	6,84 ± 0,80	1,54 ± 0,21	0,69 ± 0,06	4,36 ± 0,50
		Inv	11,29 ± 1,07	3,05 ± 0,52	2,28 ± 0,72	6,60 ± 0,31
		média	9,38 ± 2,51	2,14 ± 0,67 (24%)	1,50 ± 0,71 (16%)	5,53 ± 1,84 (60%)
Restante parte edível	Zona A	Pri	4,71 ± 0,45	0,89 ± 0,49	0,75 ± 0,08	2,81 ± 0,58
		Ver	9,69 ± 1,84	2,02 ± 0,84	1,38 ± 0,43	7,56 ± 0,73
		Out	6,15 ± 1,29	1,93 ± 0,55	0,38 ± 0,14	4,43 ± 1,01
		Inv	8,04 ± 2,04	1,47 ± 0,55	0,96 ± 0,36	5,51 ± 1,16
		média	7,15 ± 2,17	1,33 ± 0,53 (21%)	0,87 ± 0,42 (12%)	4,58 ± 2,04 (67%)
	Zona B	Pri	1,38 ± 0,07	0,42 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,94 ± 0,19
		Ver	2,90 ± 0,94	0,66 ± 0,09	0,66 ± 0,18	1,29 ± 0,21
		Out	3,03 ± 1,03	0,99 ± 0,20	0,18 ± 0,03	2,13 ± 0,71
		Inv	1,85 ± 0,13	0,57 ± 0,08	0,26 ± 0,02	1,47 ± 0,18
		média	2,29 ± 0,81	0,66 ± 0,24 (27%)	0,26 ± 0,07 (13%)	1,46 ± 0,50 (60%)
	Zona C	Pri	3,10 ± 0,30	1,21 ± 0,14	0,37 ± 0,12	2,11 ± 0,60
		Ver	2,64 ± 0,45	1,09 ± 0,25	0,76 ± 0,14	1,93 ± 0,53
		Out	3,77 ± 1,14	1,26 ± 0,36	0,34 ± 0,09	1,68 ± 0,52
		Inv	2,48 ± 0,40	0,99 ± 0,10	0,66 ± 0,06	1,80 ± 0,07
		média	3,00 ± 0,58	1,14 ± 0,12 (32%)	0,53 ± 0,21 (15%)	1,88 ± 0,18 (53%)

(n=9; FI: fração insolúvel; FEPM: fração proteica de elevado peso molecular; FBPM: fração proteica de baixo peso molecular).

Tabela 7.2 – Concentração de Cu (total e subcelular) (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes zonas da Ria Formosa.

		Total (nmol g ⁻¹ peso seco)	FI (nmol g ⁻¹ peso seco)	FEPM (nmol g ⁻¹ peso seco)	FBPM (nmol g ⁻¹ peso seco)	
Brânquias	Zona A	Pri	116,3 ± 17,9	37,0 ± 10,8	18,0 ± 1,2	56,7 ± 5,8
		Ver	182,0 ± 11,4	62,7 ± 2,3	43,7 ± 2,0	77,0 ± 9,0
		Out	135,0 ± 24,5	43,7 ± 13,7	25,3 ± 1,8	52,3 ± 4,5
		Inv	189,3 ± 40,5	65,0 ± 24,2	31,0 ± 4,7	96,7 ± 9,9
		média	155,7 ± 35,6	52,1 ± 13,9 (34%)	29,5 ± 10,8 (19%)	70,7 ± 20,4 (47%)
	Zona B	Pri	135,3 ± 5,4	35,3 ± 8,9	19,7 ± 3,2	57,3 ± 7,7
		Ver	161,3 ± 6,9	55,7 ± 13,8	38,3 ± 10,4	67,7 ± 2,7
		Out	96,3 ± 6,4	39,3 ± 8,9	17,0 ± 3,0	40,0 ± 1,7
		Inv	241,0 ± 69,5	72,3 ± 17,3	36,7 ± 3,9	111,0 ± 30,2
		média	158,5 ± 61,1	50,7 ± 16,9 (35%)	27,9 ± 11,1 (19%)	69,0 ± 30,2 (46%)
	Zona C	Pri	131,3 ± 14,2	42,7 ± 12,0	22,7 ± 4,8	65,7 ± 4,1
		Ver	163,0 ± 14,2	57,7 ± 9,8	36,3 ± 3,0	69,3 ± 3,8
		Out	125,7 ± 29,7	36,0 ± 10,0	30,0 ± 6,0	59,7 ± 3,7
		Inv	161,3 ± 21,6	60,0 ± 13,6	24,7 ± 2,4	76,7 ± 7,3
		média	145,3 ± 19,6	49,1 ± 11,6 (34%)	28,4 ± 6,1 (20%)	67,8 ± 7,1 (47%)
Glândula digestiva	Zona A	Pri	138,7 ± 7,0	50,7 ± 8,3	20,7 ± 2,2	67,3 ± 2,6
		Ver	205,7 ± 5,2	77,7 ± 5,2	38,3 ± 1,5	89,3 ± 8,7
		Out	149,0 ± 13,6	36,0 ± 7,2	24,0 ± 0,6	89,0 ± 7,5
		Inv	193,3 ± 16,8	60,7 ± 4,8	34,3 ± 5,2	98,3 ± 16,9
		média	171,7 ± 32,8	56,3 ± 17,5 (33%)	29,3 ± 8,4 (17%)	86,0 ± 13,2 (50%)
	Zona B	Pri	159,3 ± 18,8	53,3 ± 8,9	28,0 ± 9,3	78,0 ± 2,9
		Ver	181,0 ± 15,3	67,7 ± 9,4	35,0 ± 3,2	78,3 ± 5,0
		Out	179,0 ± 22,9	59,3 ± 8,2	36,7 ± 6,2	83,0 ± 9,0
		Inv	200,0 ± 11,8	71,3 ± 12,9	25,7 ± 4,2	102,7 ± 5,2
		média	179,8 ± 16,6	62,9 ± 8,1 (35%)	31,3 ± 5,3 (18%)	85,5 ± 11,7 (47%)
	Zona C	Pri	164,7 ± 5,2	68,3 ± 2,8	26,3 ± 4,3	70,0 ± 2,5
		Ver	193,3 ± 21,4	77,7 ± 8,4	30,0 ± 4,4	85,7 ± 8,8
		Out	131,3 ± 16,0	47,0 ± 10,6	26,7 ± 1,8	57,7 ± 7,6
		Inv	159,0 ± 20,5	45,0 ± 2,5	27,0 ± 3,2	87,0 ± 15,7
		média	162,1 ± 25,4	59,5 ± 16,1 (36%)	27,5 ± 1,7 (17%)	75,1 ± 13,9 (47%)
Restante parte edível	Zona A	Pri	75,7 ± 28,6	25,3 ± 11,8	14,7 ± 5,7	35,7 ± 11,6
		Ver	166,7 ± 46,3	49,3 ± 14,0	28,0 ± 4,6	74,3 ± 16,9
		Out	111,7 ± 24,3	33,0 ± 7,0	19,3 ± 4,1	59,3 ± 13,8
		Inv	150,7 ± 49,7	52,7 ± 20,0	20,0 ± 6,1	75,0 ± 23,3
		média	126,2 ± 40,8	40,1 ± 13,1 (33%)	20,5 ± 5,5 (17%)	61,1 ± 18,4 (50%)
	Zona B	Pri	60,7 ± 9,0	17,0 ± 0,6	10,3 ± 2,9	33,3 ± 5,8
		Ver	100,0 ± 17,6	33,3 ± 6,7	17,3 ± 3,2	49,3 ± 9,2
		Out	97,0 ± 14,7	30,3 ± 5,8	21,7 ± 4,8	45,0 ± 8,6
		Inv	81,7 ± 17,9	23,3 ± 5,8	19,3 ± 3,8	39,0 ± 9,3
		média	84,8 ± 18,0	26,0 ± 7,3 (30%)	17,2 ± 4,9 (20%)	41,7 ± 7,0 (50%)
	Zona C	Pri	68,0 ± 5,8	20,7 ± 1,2	12,3 ± 1,3	35,0 ± 4,7
		Ver	77,3 ± 11,9	22,7 ± 0,7	14,0 ± 2,1	40,7 ± 10,9
		Out	78,0 ± 19,2	29,0 ± 9,0	14,3 ± 3,0	34,7 ± 7,6
		Inv	87,7 ± 13,5	28,7 ± 3,0	15,3 ± 3,2	43,7 ± 12,1
		média	77,8 ± 8,0	25,3 ± 4,2 (32%)	14,0 ± 1,2 (18%)	38,5 ± 4,4 (50%)

(n=9; FI: fração insolúvel; FEPM: fração proteica de elevado peso molecular; FBPM: fração proteica de baixo peso molecular).

Tabela 7.3 – Concentração de Zn (total e subcelular) (média \pm σ) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes zonas da Ria Formosa.

		Total (nmol g ⁻¹ peso seco)	FI (nmol g ⁻¹ peso seco)	FEPM (nmol g ⁻¹ peso seco)	FBPM (nmol g ⁻¹ peso seco)	
Brânquias	Zona A	Pri	1255 ± 178	818 ± 158	171 ± 30	267 ± 24
		Ver	1647 ± 165	837 ± 156	426 ± 43	184 ± 81
		Out	1642 ± 112	1148 ± 48	202 ± 38	292 ± 34
		Inv	1592 ± 59	907 ± 16	514 ± 39	171 ± 31
		média	1534 ± 188	952 ± 203 (62%)	328 ± 168 (22%)	254 ± 98 (16%)
	Zona B	Pri	1644 ± 118	1145 ± 91	308 ± 30	192 ± 30
		Ver	1570 ± 50	835 ± 82	429 ± 18	306 ± 38
		Out	1472 ± 11	1042 ± 67	242 ± 63	188 ± 22
		Inv	2074 ± 274	1181 ± 173	502 ± 58	392 ± 48
		média	1690 ± 266	1051 ± 155 (62%)	370 ± 117 (22%)	269 ± 98 (16%)
	Zona C	Pri	1763 ± 270	1336 ± 178	299 ± 95	128 ± 22
		Ver	1738 ± 77	1183 ± 105	227 ± 27	328 ± 58
		Out	1507 ± 73	1099 ± 110	216 ± 45	192 ± 24
		Inv	1509 ± 68	780 ± 25	468 ± 53	261 ± 12
		média	1629 ± 140	1099 ± 234 (67%)	302 ± 116 (19%)	228 ± 86 (14%)
Glândula digestiva	Zona A	Pri	1410 ± 68	815 ± 80	318 ± 32	276 ± 7
		Ver	1494 ± 141	953 ± 60	319 ± 21	222 ± 113
		Out	1315 ± 51	736 ± 34	342 ± 74	238 ± 71
		Inv	1270 ± 117	498 ± 69	592 ± 32	179 ± 36
		média	1372 ± 100	701 ± 174 (54%)	393 ± 134 (29%)	279 ± 165 (17%)
	Zona B	Pri	1510 ± 95	801 ± 28	520 ± 99	190 ± 31
		Ver	1320 ± 72	519 ± 58	449 ± 80	353 ± 77
		Out	1083 ± 18	529 ± 78	372 ± 27	183 ± 65
		Inv	1315 ± 89	635 ± 111	513 ± 123	167 ± 34
		média	1307 ± 175	621 ± 131 (47%)	463 ± 69 (35%)	223 ± 87 (18%)
	Zona C	Pri	1240 ± 84	533 ± 43	511 ± 63	196 ± 27
		Ver	1645 ± 237	766 ± 77	376 ± 141	503 ± 51
		Out	1246 ± 37	779 ± 34	283 ± 30	185 ± 18
		Inv	1252 ± 49	440 ± 3	609 ± 42	203 ± 44
		média	1346 ± 200	630 ± 169 (47%)	445 ± 144 (33%)	272 ± 154 (20%)
Restante parte edível	Zona A	Pri	738 ± 143	438 ± 153	216 ± 8	184 ± 22
		Ver	1076 ± 65	528 ± 92	353 ± 49	194 ± 25
		Out	997 ± 29	691 ± 14	150 ± 20	157 ± 41
		Inv	929 ± 146	376 ± 124	379 ± 22	175 ± 53
		média	935 ± 144	508 ± 137 (53%)	274 ± 110 (29%)	153 ± 48 (18%)
	Zona B	Pri	861 ± 23	499 ± 18	213 ± 21	149 ± 16
		Ver	1001 ± 46	531 ± 79	318 ± 50	175 ± 31
		Out	949 ± 83	570 ± 80	202 ± 43	178 ± 67
		Inv	1008 ± 107	405 ± 29	452 ± 80	151 ± 49
		média	955 ± 68	501 ± 71 (52%)	296 ± 116 (31%)	163 ± 15 (17%)
	Zona C	Pri	1114 ± 116	705 ± 80	267 ± 65	142 ± 6
		Ver	1045 ± 53	540 ± 55	314 ± 75	192 ± 33
		Out	816 ± 96	520 ± 76	156 ± 25	140 ± 21
		Inv	976 ± 27	433 ± 18	350 ± 38	193 ± 42
		média	988 ± 127	550 ± 114 (56%)	272 ± 84 (27%)	167 ± 30 (17%)

(n=9; FI: fracção insolúvel; FEPM: fracção proteica de elevado peso molecular; FBPM: fracção proteica de baixo peso molecular).

7.3.3. CONCENTRAÇÃO DE MT

A concentração de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível da amêijoia *R. decussatus*, recolhidas nas três zonas da Ria Formosa durante um ano, encontra-se na Figura 7.6.

A concentração de MT nos diferentes tecidos da amêijoia (Figura 7.6), apresenton o mesmo padrão de distribuição da concentração de Cd. A concentração de MT mais elevada (48%) foi encontrada na glândula digestiva, seguida das brânquias (35%) e restante parte edível (17%), e foi significativamente diferente entre os tecidos ($p < 0,05$). Assim, a distribuição de MT entre os tecidos decrescen da glândula digestiva > brânquias > resto.

A distribuição espacial da concentração de MT nos diferentes tecidos também foi semelhante à do Cd, e por isso dependente da zona. De facto, a concentração máxima de MT ocorreu na zona A (730 ± 34 nmol g⁻¹ nas brânquias, 995 ± 44 nmol g⁻¹ na glândula digestiva e 385 ± 37 nmol g⁻¹ na restante parte edível) e foi significativamente diferente das outras duas zonas ($p < 0,05$) (Figura 7.6).

A variação sazonal da concentração de MT na zona A foi também similar à do Cd, com níveis de MT nas brânquias significativamente superiores no Verão e no Inverno quando comparadas com os do Outono. Por outro lado, na glândula digestiva, só foram observadas diferenças significativas entre o Verão e a Primavera. Para a restante parte edível, os níveis de MT no Verão foram significativamente diferentes dos observados na Primavera e Outono ($p < 0,05$) (Figura 7.6A). Para as zonas B e C não se observaram variações sazonais na concentração de MT nos três tecidos (Figuras 7.6B-C).

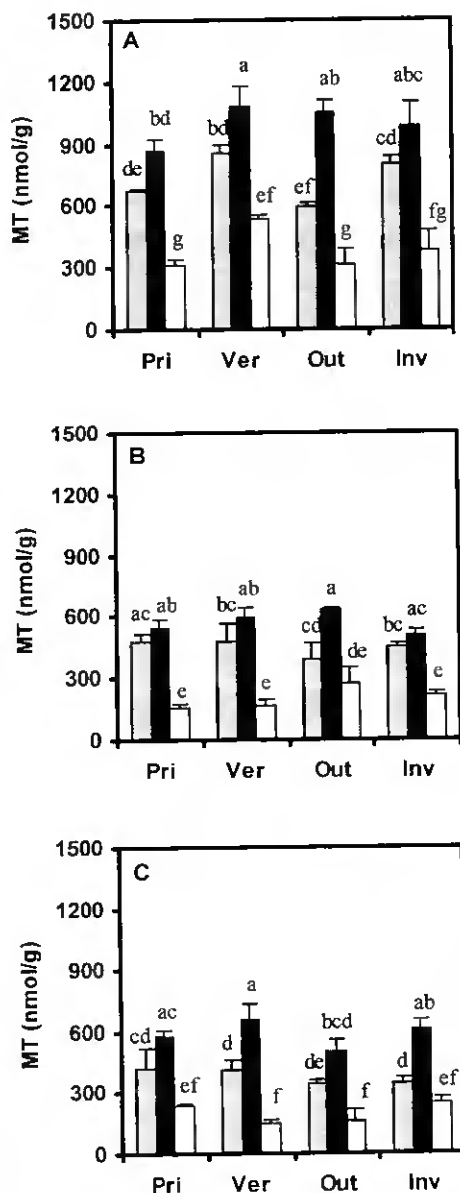


Figura 7.6 – Variação sazonal da concentração de MT (média $\pm \sigma$) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas nas zonas A, B e C da Ria Formosa. (valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)).

7.3.4. INFLUÊNCIA DO PESO

As variações no Índice de Condição (IC) reflectem principalmente as alterações sazonais no peso dos diferentes tecidos. A relação entre o IC de cada tecido e as concentrações dos metais e MT encontra-se na Figura 7.7. As concentrações de metais e MT aumentaram com o aumento do IC, nas brânquias e na glândula digestiva (Figura 7A-B). No entanto, estas relações só foram significativas para o Cd ($Cd_b = 2,7 + 3,4 \text{ ICI}$, $r = 0,688$; $Cd_{gd} = 4,8 + 2,4 \text{ IC}$, $r = 0,580$), Cu ($Cu_b = 109 + 27,5 \text{ CI}$, $r = 0,537$; $Cu_{gd} = 142 + 7,9 \text{ IC}$, $r = 0,541$) e MT ($MT_b = 274 + 154 \text{ IC}$, $r = 0,792$; $MT_{gd} = 467 + 68 \text{ IC}$, $r = 0,648$) mas não para o Zn (Figura 7.7A-B). Na restante parte edível, as concentrações de metais e MT diminuíram com o aumento do IC. Estas relações negativas apenas foram significativas para o Cu ($Cu_r = 150 - 12,2 \text{ IC}$, $r = 0,742$) e para o Zn ($Zn_r = 1090 - 29,8 \text{ IC}$, $r = 0,586$), indicando a existência de concentrações baixas de metais essenciais com o aumento do peso da restante parte edível (Figura 7.7C).

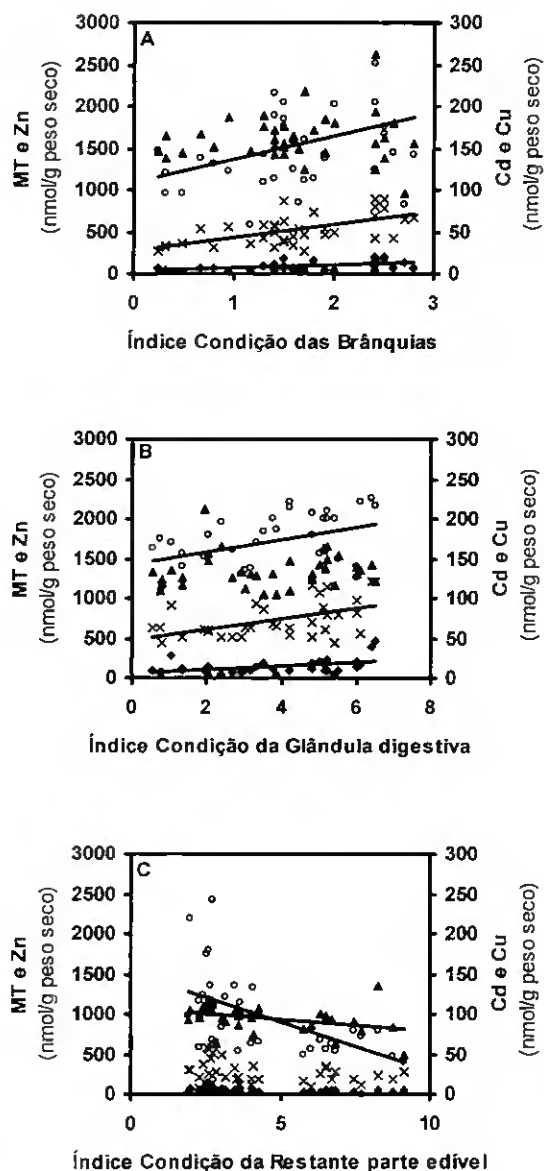


Figura 7.7 — Relação entre a concentração de Cd, Cu, Zn e MT e o índice de condição (IC) nos diferentes tecidos da amêijoia: (A) brânquias; (B) glândula digestiva; (C) restante parte edível.

7.3.5. RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE MT E DE METAIS

As relações entre os teores de MT e Cd ou entre os de MT e Cu nos três tecidos encontram-se na Figura 7.8. Os níveis de MT aumentaram linearmente com o aumento das concentrações de Cd (total e na fracção FBPM) em todos os tecidos, e este aumento foi significativamente superior na fracção FBPM ($p < 0,05$) (Figura 7.8A-B). Apenas foi encontrada uma relação significativa entre a MT e Cu na restante parte edível (total e FBPM) (Figura 7.8C-D), apesar de existir uma quantidade significativa de Cu ligada à MT nos outros dois tecidos. Por outro lado, não foi observada nenhuma relação significativa entre as concentrações de MT e Zn em qualquer dos tecidos.

No sentido de comparar fontes de variação entre as concentrações de MT, metais (Cd, Cu e Zn) e peso do tecido (W), efectuou-se uma análise de regressão múltipla para expressar MT em função do metal (nmol g^{-1}) e do peso (g). Estas variáveis foram padronizadas e expressas de acordo com a seguinte função: $\text{MT} = f(\text{Cd}, \text{Cu}, \text{Zn}, \text{W})$. Este modelo foi aplicado aos três tecidos, considerando os dados conjuntos das três zonas e usando as concentrações de metal total e da fracção citosólica (FBPM) (Tabela 7.4).

O Cd foi o metal que mais afectou os níveis de MT em todos os tecidos, quer na fracção total quer na fracção subcelular FBPM. De facto, só o Cd contribuiu com mais de 65% na variação de MT. Por outro lado, as concentrações de Cu e Zn não afectaram significativamente os níveis de MT. A influência do peso também foi observada nas brânquias e na glândula digestiva (Tabela 7.4).

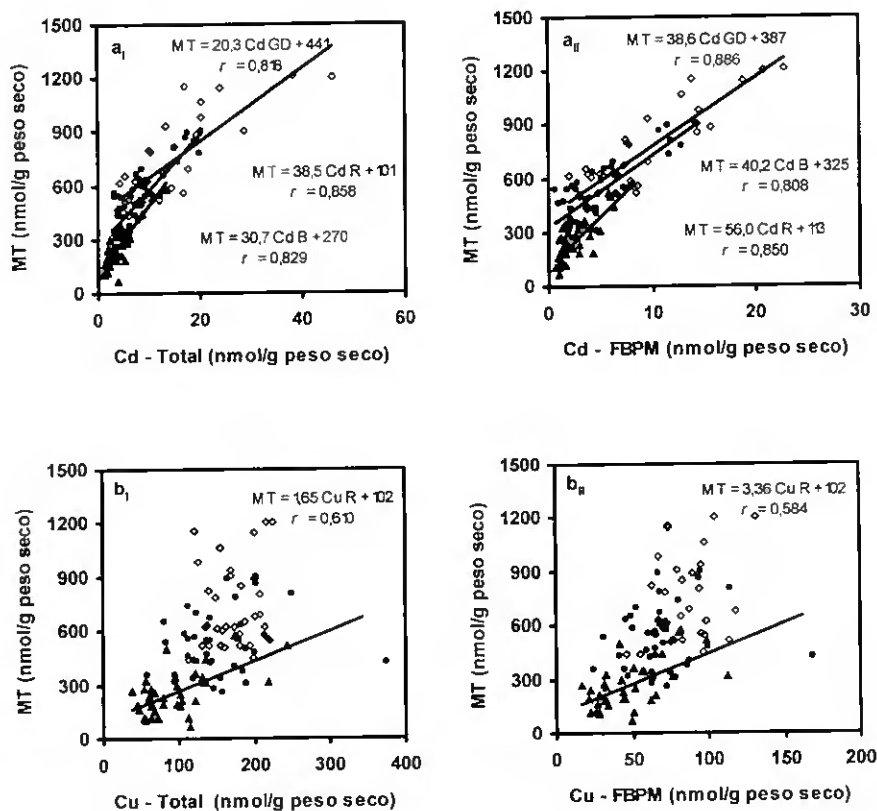


Figura 7.8 – Relação entre a concentração de MT e a concentração de Cd e Cu no total e na fracção subcelular de baixo peso molecular (FBPM) nos diferentes tecidos da amêijoas: (a_I) Cd total; (a_{II}) Cd FBPM; (b_I) Cu total; (b_{II}) Cu FBPM.

(●) B - brânquias; (◇) GD - glândula digestiva; (▲) R - restante parte edível.

Tabela 7.4 – Variação da concentração de MT em função do metal (total e fração FBPM) (nmol g^{-1}) e do peso (g), nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas na Ria Formosa.

Brânquias	Total	$n = 108, r = 0,858$ $MT = 0,184 + 0,735Cd - 0,098Cu - 0,218Zn - 0,250W$ ($p < 0,001$) ($p = 0,267$) ($p = 0,252$) ($p < 0,05$)
	FBPM	$n = 108, r = 0,844$ $MT = 0,035 + 0,743Cd - 0,148Cu - 0,095Zn - 0,267W$ ($p < 0,001$) ($p = 0,446$) ($p = 0,509$) ($p < 0,05$)
Glândula digestiva	Total	$n = 108, r = 0,856$ $MT = 0,361 + 1,009Cd - 0,198Cu + 0,106Zn + 0,250W$ ($p < 0,001$) ($p = 0,075$) ($p = 0,467$) ($p < 0,05$)
	FBPM	$n = 108, r = 0,898$ $MT = -0,084 + 0,928Cd - 0,158Cu - 0,080Zn + 0,154W$ ($p < 0,001$) ($p = 0,155$) ($p = 0,459$) ($p = 0,139$)
Restante parte edível	Total	$n = 108, r = 0,866$ $MT = 0,271 + 0,849Cd + 0,126Cu + 0,089Zn + 0,071W$ ($p < 0,001$) ($p = 0,412$) ($p = 0,521$) ($p = 0,544$)
	FBPM	$n = 108, r = 0,856$ $MT = 0,194 + 0,772Cd + 0,114Cu + 0,007Zn + 0,098W$ ($p < 0,001$) ($p = 0,441$) ($p = 0,961$) ($p = 0,449$)

(nos parêntesis encontra-se a o nível de significância da probabilidade baseada no *t*-teste)

7.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Existem poucos estudos em que a MT em moluscos bivalves foi utilizada como biomarcador de exposição metálica em ecossistemas marinhos, e ainda menos com a amêijoia *R. decussatus*. Apesar desta espécie apresentar a capacidade de acumular metais e induzir a síntese de MT, como resultado da exposição metálica, não se conhece a relação entre o metabolismo dos metais e a variabilidade de MT nos diferentes tecidos da *R. decussatus* (Serafim & Bebianno, 2001 - Capítulo II).

A distribuição da concentração de metais nos diferentes tecidos da *R. decussatus* demonstrou depender do metal. A concentração mais elevada de Cd foi detectada na glândula digestiva (Figura 7.3), enquanto que a do Zn foi nas brânquias (Figura 7.5). Contudo, para o Cu não existem diferenças significativas entre estes dois tecidos (Figura 7.4, Tabela 7.1-7.3). As brânquias e a glândula digestiva da *R. decussatus* são, portanto, os tecidos mais interessantes do ponto de vista ecotoxicológico. Estes tecidos apresentam concentrações metálicas mais elevadas quando comparadas com a restante parte edível e reflectem a biodisponibilidade da concentração de metais no sistema lagunar. As brânquias estão em contacto directo com o ambiente circundante e reflectem a exposição metálica a curto prazo, enquanto que a glândula digestiva, onde existe um grande número de metaloenzimas que se ligam, metabolizam e acumulam o excesso de metais, actua como um órgão de armazenamento reflectindo uma exposição metálica a longo prazo (Bebianno *et al.*, 1993, 1994). Estes resultados parecem indicar que a concentração metálica é dependente da função fisiológica de cada tecido e, particularmente para o Cd, em que estes tecidos reflectem a sua concentração neste ambiente natural.

As concentrações de Cd e de Cu na glândula digestiva de *R. decussatus* foram da mesma ordem de grandeza das recolhidas na Costa da Tunísia (0,40 e 5,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco, para Cd e Cu, respectivamente) e do Mediterrâneo (0,10 e 2,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco para Cd e Cu, respectivamente). Enquanto que, a concentração de Zn foi mais baixa (31,3 e 32,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco) (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999; Roesijadi, 1994a). Para espécies como a ostra *C. gigas* e o mexilhão *M. edulis* as concentrações de metais mais elevadas foram na glândula digestiva, tal como na amêijoia *R. decussatus*.

Enquanto que, para o mexilhão *M. galloprovincialis* foram nas brânquias (Serra *et al.*, 1999).

7.4.1. VARIAÇÃO ESPACIAL E SAZONAL DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS

De entre os três metais, o Cd apresentou a variação espacial e sazonal mais evidente em cada um dos tecidos, com uma variabilidade espacial mais significativa comparativamente com a sazonal. A variação espacial da concentração de Cd no mexilhão de água doce *P. grandis* ao longo de um gradiente de contaminação foi igualmente mais importante do que a variação sazonal (Wang *et al.*, 1999). A concentração de Cd nos tecidos da amêijoia, *R. decussatus*, decresceu da zona A para a C e foram mais elevados no Verão e no Inverno (Figura 7.3). Esta sazonalidade foi observada em todas as zonas apesar de ter sido mais evidente na zona A. Este padrão espacial e sazonal pode estar relacionado com um aumento da introdução de Cd na lagoa durante estes períodos. Durante o Verão, a população aumenta dez vezes e o aumento da temperatura produz um efeito sinérgico na acumulação de Cd nas amêijoas. O aumento da temperatura também aumenta a taxa de filtração do mexilhão *M. galloprovincialis* e por isso é acumulado mais Cd biodisponível (Serafim *et al.*, 2002). No entanto, as diferenças de temperatura parecem não afectar os níveis de metais na glândula digestiva de machos e fêmeas na amêijoia *R. decussatus* (Serafim & Bebianno, 2001). No Inverno o aumento dos níveis de Cd está relacionado com outras fontes difusas, tais como escoamentos da agricultura e urbanas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que identificaram a existência de um aumento de compostos de natureza antrópica próximo das áreas com maior população urbana da lagoa (Cortesão *et al.*, 1986; Bebianno, 1995).

Apesar da variabilidade da concentração metálica na lagoa (Cortesão *et al.*, 1986) não ocorreu uma variação espacial ou sazonal significativa nos tecidos da amêijoia para os outros dois metais. No entanto, foram observados valores ligeiramente mais elevados na concentração de Cu nas zonas A e B em todos os tecidos, e no Verão e Inverno para as concentrações de Cu e Zn nas brânquias e na glândula digestiva (Figuras 7.4 e 7.5). O facto das concentrações de Zn não variarem a nível espacial e

sazonal (Figura 7.5) também está de acordo com estudos anteriores, que sugerem que estas amêijoas são capazes de regular os níveis deste metal nos seus tecidos (Cortesão *et al.*, 1986; Bebianno *et al.*, 1993; Castro *et al.*, 1996; Serafim & Bebianno, 2001).

No gastrópode *L. littorea* recolhido na costa de Inglaterra, verificou-se que os níveis de Cu e Zn não estavam igualmente relacionados com as flutuações da concentração destes metais no ambiente natural (Langston & Zhou, 1986). Similarmente, as concentrações de Cu e Zn não sofreram alterações nos bivalves de água doce *A. grandis*, *P. grandis* e *C. fulminea* recolhidos em zonas influenciadas por descargas de minas no Quebec e nos rios Danúbio e Lot (França) (Couillard *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999; Gundacker, 2000; Andrès *et al.*, 1999). Contrariamente, para os bivalves *M. galloprovincialis* e *Diplodon chilensis* foi encontrada uma relação directa entre os níveis de Cu e Zn acumulados nos seus tecidos e presentes no ambiente (Valdovinos *et al.*, 1998; Serra *et al.*, 1999).

7.4.2. DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DE METAIS

A concentração mais elevada de Cd foi detectada no citosol (FEPM + FBPM) em todos os tecidos (Tabela 7.1). A quantidade de Cd nesta fracção apresentou uma grande variabilidade, de acordo com a zona e a época do ano, variando entre 65 e 80% do Cd total. No citosol a concentração de Cd mais elevada foi sempre na fracção FBPM, principalmente ligado à MT (Tabela 7.1), estando as alterações na concentração de Cd directamente relacionadas com as de MT (Figura 7.6). Estes resultados confirmam os obtidos em estudos laboratoriais anteriores, que mostraram que no citosol a MT constitui o principal ligando do Cd nesta espécie (Bebianno *et al.*, 1993, 1994; Roméo & Gnassia-Barelli, 1995; Bebianno & Serafim, 1998; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999; Serafim & Bebianno, 2001).

A concentração de Cd nas brânquias aumentou apenas na fracção FBPM e não nas outras duas fracções subcelulares (FI e FEPM) na zona mais contaminada (zona A). Tal como para a concentração de Cd total, a concentração na fracção FBPM também aumentou significativamente no Verão (76%) e no Inverno (71%), quando comparada com a Primavera e o Outono ($p < 0,05$). O aumento de Cd na fracção FBPM induz a

síntese de MT impedindo que o excesso de Cd se ligue à fracção insolúvel (associado às vesículas e organelos) ou às proteínas da fracção FEPM (associado a enzimas). Uma vez que, a concentração de Cd nas outras duas fracções subcelulares não se alteraram, a razão Cd solúvel/Cd insolúvel variou apenas devido a alterações da concentração de Cd na fracção FBPM. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a glândula digestiva nesta espécie onde a razão solúvel/insolúvel foi semelhante (Hamza-Chaffai *et al.*, 2000). Assim, a concentração de MT induzida e/ou constitutiva (Figura 7.6) foi suficiente para capturar os iões Cd livres nas células, impedindo qualquer dano celular e alterações no metabolismo normal desta espécie.

Nas brânquias do mexilhão *M. galloprovincialis* foram também observadas alterações na distribuição do Cd subcelular entre as fracções solúveis e insolúveis ao longo do ano (Serra *et al.*, 1999). No entanto, nas brânquias do bivalve de água doce *P. grandis* o Cd não variou sazonalmente e a sua concentração na fracção de baixo peso molecular manteve-se constante - 1 nM Cd^{2+} , após o que as concentrações de Cd aumentaram significativamente, principalmente ligado à glutathione (Wang *et al.*, 1999). Pelo contrário, na ostra *C. gigas* (exposta a $200\text{ }\mu\text{g Cd l}^{-1}$ durante 21 dias) a concentração de Cd aumentou na fracção insolúvel com o tempo de exposição. A quantidade de Cd na fracção insolúvel teve origem na formação do complexo Cd-MT que passa subsequentemente para a fracção particulada ligada a membranas ou grânulos intracelulares (George & Viarengo, 1985).

Em contraste com o observado para o Cd, apesar da maior percentagem de Cu se encontrar na fracção citosólica (60 – 70%) em todos os tecidos, não ocorreu nenhuma variação espacial e sazonal na concentração subcelular de Cu (Tabela 7.2). 52% do total de Cu foi também detectado no citosol do total da parte edível de *R. decussatus* (Bebiano *et al.*, 1993). Uma distribuição subcelular semelhante de Cu foi observada na glândula digestiva de *R. decussatus*, com 34% do Cu na fracção insolúvel em amêijoas expostas a Cu ($75\text{ }\mu\text{g Cu l}^{-1}$) durante 5 dias (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que as alterações na concentração de Cu na laguna não produziram alterações significativas na distribuição subcelular de Cu nos tecidos

desta amêijoia. Os teores de Cu subcelular são, portanto os níveis basais requeridos para o normal metabolismo da amêijoia.

Em contraste com os outros dois metais, a maior percentagem de Zn em todos os tecidos encontra-se na forma insolúvel (Tabela 7.3), preferencialmente associado a proteínas membranares ou lipoproteínas (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995). Nas brânquias de *R. decussatus*, o Zn na fracção insolúvel (62%) foi significativamente mais elevado quando comparado com os outros dois tecidos ($p < 0,05$) e diminuiu no citosol: 16% na FBPM e 22% na FEPM (Tabela 7.3). Na FBPM das brânquias, o Zn diminuiu de 68% para 59% (Tabela 7.3), sugerindo que o Zn ligado a MT foi substituído e consequentemente armazenado na fracção insolúvel, uma vez que a concentração total de Zn não se alterou. A modificação da razão Zn solúvel/Zn insolúvel indica uma perturbação no metabolismo normal do organismo em presença de Cd. À excepção das brânquias, a distribuição subcelular de Zn foi idêntica nas diferentes zonas e estações do ano, sugerindo que os outros tecidos apresentam capacidade de regular a concentração de Zn.

Numa população de *C. virginica*, a partição da quantidade de Cd, Cu e Zn no citosol das brânquias também foi dependente do local e da época do ano. Estando presentes no citosol 66% de Cd, 23% de Cu e 28% de Zn, tendo sido observadas trocas entre Cd e Zn nos locais de ligação metálica (Roesijadi, 1994a).

7.4.3 CONCENTRAÇÃO DE MT NOS DIFERENTES TECIDOS

A concentração de MT nos tecidos das amêijoas recolhidas nas três zonas revelou a mesma distribuição espacial e sazonal de Cd (Figura 7.6). Analogamente, o modelo que descreve a relação entre MT, metais e peso nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, também mostrou que o Cd foi o único metal que influencia a síntese de MT em todos os tecidos (Tabela 7.4). De facto, a concentração de Cd aumentou na fracção citosólica juntamente com a de MT em todos os tecidos, particularmente nas brânquias. A MT induzida e/ou existente foi suficiente para ligar os iões de Cd livres presentes na célula, impedindo qualquer dano no metabolismo celular.

A variação espacial da concentração de MT foi mais importante que a variação sazonal, em que a concentração de MT esteve significativamente relacionada com os níveis de Cd em todos os tecidos (Figura 7.8, Tabela 7.4). Assim, a variação sazonal da concentração de metais e MT nas brânquias e glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* está relacionada com a diferente biodisponibilidade ambiental de Cd (Figura 7.7).

Estes dados de campo confirmam os resultados laboratoriais que mostram a indução da síntese de MT na totalidade da parte edível, brânquias e glândula digestiva da *R. decussatus* exposta a concentrações sub-letais de Cd (4, 40, 100 e 400 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$). (Capítulo III; Bebianno *et al.*, 1993, 1994). O aumento da ligação de Cd à MT suporta a função de desintoxicação proposta para a MT contra os efeitos tóxicos deste metal e a utilização desta proteína como biomarcador de exposição de Cd nestes tecidos de *R. decussatus* (Bebianno *et al.*, 1993, 1994).

Para os outros dois metais, a MT apenas se relacionou com o Cu (total e citosólico) na restante parte edível (Figura 7.8). O ligeiro aumento de Cu detectado nos tecidos de *R. decussatus*, nem sempre deu origem a uma relação nítida com a indução de MT. O tempo de meia vida da Cu-MT nos tecidos desta amêijoia é mais rápida que o tempo de Cd-MT, sugerindo que Cu-MT neste tecido pode degradar-se mais rapidamente quando o Cu está presente em excesso (Capítulos III e IV) e por isso os níveis de Cu na laguna não induzem *de novo* a síntese de MT em *R. decussatus*. Contudo, são necessários mais estudos para confirmar esta conclusão. Apesar do facto de noutros estudos de campo os níveis de MT na glândula digestiva da *R. decussatus* estarem relacionados com as concentrações de Cu e Zn (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000), os níveis destes dois metais presentes na Ria Formosa não induzem claramente MT nesta espécie. A distribuição subcelular de Cu não se alterou, mas o Zn foi redistribuído entre a fracção citosólica e insolúvel. Analogamente, não ocorreu um aumento significativo na concentração de MT na glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* exposta a 75 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 5 dias ($0,52 \pm 0,17$ para $0,62 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$ peso seco) (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998). Tal como na *R. decussatus*, a concentração de MT nas brânquias do bivalve de água doce *P. grandis* respondeu à contaminação ambiental por Cd, mas não à de Cu ou Zn (Wang *et al.*, 1999).

Desta forma o presente estudo revela que no sistema lagunar da Ria Formosa, o Cd é o metal directamente responsável pelas alterações das ligações dos metais à MT. Tal como noutras espécies de moluscos, como os mexilhões *M. edulis* e *M. galloprovincialis* e a ostra *C. virginica* (Bebianno & Langston, 1991, 1992; Roesijadi, 1994a), na *R. decussatus* a MT é também induzida pelo Cd que compete com o Zn para os locais metal-ligando recém criados.

Examinando o número de iões metálicos ligados em média por molécula de MT demonstra-se que a MT é predominantemente uma proteína de Cd e de Cu. Na zona onde os valores de Cd foram mais elevados, a razão MT:Cd foi de apenas de 1:0,02 em todos os tecidos, estando longe da razão de saturação desta molécula (1:7 ou 1:6) (Dieter *et al.*, 1987). Experiências laboratoriais revelaram também que, a capacidade de ligação desta proteína na *R. decussatus* está longe de ser ultrapassada mesmo após 30 dias de exposição a Cd ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) onde a razão MT:Cd foi de 1:3 (Bebianno *et al.*, 1993).

Em estudos realizados com outras populações naturais de bivalves, o aumento tanto da MT como dos metais ligados à MT em ambientes contaminados por metais está geralmente associado com um aumento da concentração de metais nos tecidos, sugerindo uma relação entre a bioacumulação de metais e a indução de MT. A concentração de MT ou de metais ligados à MT nas populações da ostra *C. virginica* e patela *Patella vulgata* aumentou em ambientes com contaminação metálica confirmando esta relação (Roesijadi, 1994a; Langston & Zhou, 1986). Nas brânquias da *C. virginica* os metais ligados à MT podem até ser previstos a partir da concentração citosólica do metal, mas não da concentração de metal total (Roesijadi, 1994a).

VII

7.4.4. INFLUÊNCIA DO PESO

Alterações no peso do corpo e no teor em metais podem ocorrer em todo o organismo ou em tecidos alvo específicos, e foram considerados no presente estudo devido à importância das flutuações sazonais do peso dos moluscos bivalves (Philips & Segar, 1986; Regoli & Orlando, 1994; Regoli, 1998). A relação entre a concentração de MT e

o peso pode ser uma consequência indirecta da influência do peso nos níveis de metais. De facto, na restante parte edível (em contraste com as brânquias e a glândula digestiva) foi observada uma relação negativa entre as concentrações de MT e de metais e o IC, confirmando que as concentrações de MT e de metais diminuem neste tecido quando o IC aumenta (Figura 7.7). No sentido de evitar estas flutuações é sugerido expressar a concentração de MT em função do IC.

A flutuação das concentrações de MT nos diferentes tecidos (totalidade da parte edível, brânquias, manto, pé com músculo aductor e a massa visceral) da *C. fulminea*, proveniente de um ambiente relativamente limpo e durante um ano, foi independente da acumulação de metais, mas relacionada com o ciclo reprodutivo (Andrés *et al.*, 1999). O ciclo reprodutivo também influencia a concentração de MT na glândula digestiva do *M. edulis* (Baudrimont *et al.*, 1997), enquanto que, na amêijoia *R. decussatus* a concentração de MT é independente do sexo dos organismos (Serafim & Bebianno, 2001).

O longo tempo de meia vida de Cd-MT pode explicar as concentrações de Cd mais elevadas, principalmente nas brânquias e na glândula digestiva destas amêijoas. Após a exposição ao Cd ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) já foram identificadas quatro isoformas de Cd-MT na glândula digestiva, cuja sequência de aminoácidos na região terminal NH_2 é semelhante a outras MTs de moluscos, principalmente em mexilhões e ostras (Simes *et al.*, 2003).

Apesar de ainda não existir consenso sobre a utilização da MT como biomarcador, devido a alterações inter e intra específicas e/ou heterogeneidade nas condições de exposição (Isani *et al.*, 2000; Cosson, 2000), os resultados apresentados indicam que nesta população natural, a concentração de MT é uma resposta à exposição ao Cd, particularmente nas brânquias e na glândula digestiva onde esta proteína pode ser utilizada como um indicador precoce à exposição ao Cd e um biomarcador útil para avaliar o estado toxicológico desta população de amêijoas da Ria Formosa. Além disso, informações adicionais sobre isoformas de Cu-MT e Zn-MT são necessárias para clarificar o papel da MT na *R. decussatus*.

CAPÍTULO VIII

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

-
- 8.1. FACTORES QUE PODEM INFLUENCIAR OS NÍVEIS DE MT NA AMÊIJOA *R. decussatus***
 - 8.2. RESPOSTA DA MT EM DIFERENTES TECIDOS DA AMÊIJOA *R. decussatus* EXPOSTA A Cd, Cu e Zn**
 - 8.3. APLICAÇÃO DA MT NUMA POPULAÇÃO NATURAL DE AMÊIJOAS *R. decussatus* NA RIA FORMOSA**
 - 8.4. CONCLUSÕES**
-

8. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Nas últimas décadas tem havido um esforço considerável no meio científico, no estudo de mecanismos bioquímicos, de forma a servirem de biomarcadores para avaliar o grau de contaminação no ambiente marinho (Cotou *et al.*, 2001). No entanto, o conceito de biomarcador mantém-se controverso, pois torna-se difícil obter uma relação clara entre os níveis de exposição e a magnitude da resposta e ainda de separar essa resposta dos níveis base (Olsvik *et al.*, 2001).

Tal como referido na Introdução deste trabalho, a determinação da concentração de MT tem sido proposta como biomarcador da exposição metálica, em várias espécies de moluscos bivalves (Cosson & Amiard, 2000). Esta proteína intracelular protege os tecidos dos organismos dos efeitos tóxicos dos metais, podendo ser utilizada como uma medida directa do estado bioquímico dos tecidos afectados. As alterações ao nível bioquímico apresentam vantagens, uma vez que estas alterações são as primeiras a serem detectadas e podem servir de marcadores de exposição e de efeito (Huggett *et al.*, 1992). No entanto, na aplicação desta proteína enquanto biomarcador continuam a persistir alguns problemas devido à complexidade dos mecanismos que regulam a sua biosíntese, a qual é influenciada por outros factores que não apenas os metais (Käji, 1991; Gerpe *et al.*, 2000).

8.1. FACTORES QUE PODEM INFLUENCIAR OS NÍVEIS DE MT NA AMÊIJOA *R. decussatus*

Atendendo ao objectivo desta tese, o qual pretende compreender de que forma a MT poderá ser utilizada como biomarcador de contaminação metálica na amêijoia *R. decussatus*, é necessário conhecer os factores endógenos e exógenos que podem afectar o indicador, de forma a minimizar fontes de variação não controladas. De facto e como referido na Introdução deste trabalho (secção 1.2.5.1), a MT sendo uma proteína induzida por metais é susceptível de responder aos diferentes factores que influenciam o metabolismo proteico e ainda a todos os factores que influenciam os teores metálicos. Assim, a variabilidade sazonal é um dos principais factores a ter

em consideração, este factor inclui os efeitos de diferentes factores abióticos, como a temperatura e salinidade (Amiard-Triquet *et al.*, 1998b; Viarengo *et al.*, 1999b) e bióticos, como o peso, idade, sexo e estado de maturação do organismo (Bordin *et al.*, 1997; Mouneyrac *et al.*, 2000; Mouneyrac *et al.*, 1998; Amiard-Triquet *et al.*, 1998b; Olsson *et al.*, 1987; Hamza-Chaffai *et al.*, 1995). Desta forma, no estudo de campo apresentado no Capítulo II, foram analisados alguns desses factores que podem influenciar o papel da MT nesta espécie, nomeadamente a sazonalidade e o sexo dos indivíduos. Neste estudo só foi utilizada a glândula digestiva de *R. decussatus*, uma vez que, este tecido poderia ser o mais afectado pelo ciclo reprodutivo, pois em muitas espécies de moluscos bivalves durante a gametogénese os tecidos gonadossomático desenvolvem-se envolvendo a glândula digestiva, criando intrusões no interior desta, o que pode levar à alteração do peso total da glândula e consequentemente provocar um efeito de “diluição”, diminuindo a concentração metálica (Regoli, 1998).

A concentração de MT e de metais (Cd, Cu e Zn) na glândula digestiva das amêijoas, provenientes de dois locais da Ria Formosa com impacto antropogénico distinto, mostrou que a sua variação não depende do sexo dos organismos, mas sim dos meses do ano e do local de amostragem, sendo máxima nos meses de Julho e Agosto no local com influência antrópica.

As diferenças na concentração de metais e de MT entre os dois locais são explicadas pelo diferente impacto relativamente à contaminação metálica. De facto, o local afastado da influência urbana (local B) não sofreu variação sazonal e apresentou teores de MT significativamente inferiores comparativamente com o local com influência antrópica (local A) (Figuras 2.2B e 2.4B_I e B_{II}). As variações sazonais observadas no local A, não estão relacionadas com as alterações do peso do tecido de origem gametogénica, uma vez que na glândula digestiva de *R. decussatus* não foram observadas intrusões de tecido gonadossomático no interior deste tecido não existindo flutuações de peso. Desta forma, a variabilidade dos teores de MT foram associados a diferentes biodisponibilidade metálica, a qual na Ria Formosa também apresenta o mesmo padrão sazonal. Neste estudo, também não foi observada a influência da temperatura nos níveis de MT, apesar deste parâmetro ser considerado um dos factores abióticos mais importantes que influência a taxa de filtração, a incorporação

de metais e a indução de MT (Serra *et al.*, 1999). De facto, as alterações de temperatura não são particularmente significativas ao longo da Ria Formosa (Falcão & Vale, 1998), no entanto o padrão de variação da concentração de metais e MT foi distinto em cada um dos locais.

Por outro lado, este estudo também revelou que a concentração desta proteína e de metais na glândula digestiva não é dependente do sexo dos organismos, pelo que a amostragem deste bivalve para a determinação de MT neste tecido, pode ser efectuada aleatoriamente.

Nesta população de amêijoas o sexo e a temperatura não afectaram a concentração de MT, parecendo ser a concentração metálica o factor determinante na síntese de MT.

8.2. RESPOSTA DA MT EM DIFERENTES TECIDOS DA AMÊIJOA *R. decussatus* EXPOSTA A Cd, Cu e Zn

Em estudos toxicológicos é frequente recorrer-se a ensaios laboratoriais, pois apesar de não conseguirem ser uma cópia fiel das condições ambientais, permitem ajudar a compreender e avaliar os efeitos dos contaminantes. Muitos estudos sobre toxicidade de metais em moluscos bivalves resultam de exposições de longa duração com concentrações realistas do ponto de vista ambiental (concentrações subletais e mistura de contaminantes). Nestas condições é possível ajustar modelos cinéticos, que permitem a determinação de medidas cinéticas, as quais são essenciais para a elaboração de modelos de acumulação e eliminação de metais nos organismos aquáticos (Chong & Wang, 2001). Nestas condições subletais os principais factores que determinam a toxicidade dos metais são: (1) distribuição dos metais pelos diferentes tecidos; (2) incorporação dos metais a nível intracelular - distribuição subcelular; (3) relação entre a concentração acumulada e o efeito da resposta (Lange *et al.*, 2002).

Nesta perspectiva os processos de bioacumulação, transferência, armazenamento e eliminação de Cd, Cu e Zn e a sua relação com os níveis de MT nos diferentes tecidos

de *R. decussatus* abordados nos Capítulos III, IV, V e VI, permitiram concluir que, de uma forma geral, todos estes metais induzem a síntese de MT. No entanto, essa indução depende dos tecidos, da concentração do metal no meio e da competição entre os metais para ligandos específicos. Estes resultados estão possivelmente relacionados com os distintos processos de acumulação (Tabela 8.1).

No caso do Cd (Capítulo III) verificou-se que os três tecidos da amêijoia acumulam este metal com padrões distintos e dependentes da concentração do meio (Tabela 8.1). Os teores de Cd foram mais elevados na glândula digestiva, seguido das brânquias e por último da restante parte edível, no entanto o incremento de Cd ao longo do tempo de exposição é superior nas brânquias. Os teores de Cd neste tecido das amêijoas expostas à concentração mais baixa ($4 \mu\text{g l}^{-1}$) aumentaram linearmente, mostrando não existir saturação dos sistemas de ligandos, enquanto que nas exposições a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ e à mistura metálica a acumulação de Cd seguiu o modelo cinético de 1ª ordem, o qual reflecte inicialmente uma assimilação rápida de Cd em relação à sua eliminação e à medida que o tempo decorre a taxa de assimilação de Cd decresce (limitada pela taxa de difusão deste metal para o interior da célula e/ou da saturação do sistema de ligandos) com a tendência para atingir um estado estacionário. Contrariamente os teores de Cd na glândula digestiva aumentaram exponencialmente nas amêijoas expostas a 4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$, enquanto que na exposição polimetálica os teores deste elemento também seguiram um modelo cinético de 1ª ordem. Por outro lado, na restante parte edível os teores de Cd aumentam linearmente com o tempo, em todas as exposições. Estes resultados provavelmente estão relacionados com a superfície de cada tecido em contacto com o Cd dissolvido (Cunningham, 1979) e/ou com os ligandos disponíveis no meio intracelular.

A distribuição subcelular de Cd nos diferentes tecidos de *R. decussatus* mostrou que a maior quantidade deste elemento se encontra associado à fracção citosólica de baixo peso molecular (FBPM), sugerindo a ligação deste elemento à MT. De facto, ao longo do período de exposição os teores de Cd nesta fracção subcelular acompanharam a evolução do total de Cd acumulado, mostrando a existência nesta fracção de ligandos (MT) disponíveis suficientes e/ou induzidos para se ligarem com o Cd.

Tabela 8.1 – Comparação entre a acumulação de Cd Cu e Zn nos diferentes tecidos da amêijoia *R. decussatus* exposta a concentrações individuais de cada metal: concentrações mais baixas (4 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, 25 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$), concentrações mais elevadas (40 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$) e à mistura metálica destes metais (100 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ + 50 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$).

	Concentrações baixas	Concentrações elevadas	Mistura metálica
Brânquias	Cd: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.	Cd: aumentou linearmente nos primeiros 30 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)	Cd: aumentou linearmente nos primeiros 21 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)
	Cu: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.	Cu: aumentou linearmente nos primeiros 14 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)	Cu: aumentou linearmente nos primeiros 21 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)
	Zn: aumentou linearmente nos primeiros 7 dias de exposição, atingindo um equilíbrio no restante período de exposição.	Zn: aumentou exponencialmente durante todo o período de exposição.	Zn: as concentrações apresentam grande variabilidade.
Glândula Digestiva	Cd: aumentou exponencialmente durante todo o período de exposição.	Cd: aumentou exponencialmente durante todo o período de exposição.	Cd: aumentou linearmente nos primeiros 14 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)
	Cu: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.	Cu: aumentou linearmente nos primeiros 21 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)	Cu: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.
	Zn: as concentrações apresentam grande variabilidade.	Zn: aumentou exponencialmente até 30º dia de exposição.	Zn: as concentrações apresentam grande variabilidade.
Restante parte edível	Cd: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.	Cd: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.	Cd: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.
	Cu: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.	Cu: aumentou linearmente nos primeiros 21 dias de exposição, atingindo um equilíbrio nos últimos dias de exposição. (modelo cinético 1ª ordem)	Cu: aumentou linearmente durante todo o período de exposição.
	Zn: aumentou linearmente nos primeiros 7 dias de exposição, atingindo um equilíbrio no restante período de exposição.	Zn: aumentou exponencialmente durante todo o período de exposição.	Zn: as concentrações apresentam grande variabilidade.

Os níveis de MT medidos na fracção subcelular FBPM das amêijoas expostas a Cd, também dependeram dos tecidos, da concentração de exposição e da forma de exposição (singular/mistura). Os níveis desta proteína foram mais elevados na glândula digestiva, tal como a concentração de Cd, no entanto, o incremento dos níveis de MT foi semelhante nas brânquias e na glândula digestiva. Por outro lado, observou-se que a síntese da indução de MT acompanhou a exposição da concentração de Cd, aumentando com o aumento da exposição. A forma de exposição também influenciou os níveis desta proteína, observando-se um aumento da síntese de MT na exposição à mistura metálica (Capítulo VI).

Relativamente à acumulação de Cu (Capítulo IV), tal como o Cd, os três tecidos acumulam Cu dependo da concentração do meio. No entanto, este elemento revelou-se bastante tóxico para a amêijoia *R. decussatus*, em que a concentração utilizada de 50 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ foi letal ao fim de 25 dias de exposição.

À semelhança da distribuição da concentração de Cd pelos diferentes tecidos, os teores de Cu também foram mais elevados na glândula digestiva, seguido das brânquias e por último da restante parte edível. No entanto, o padrão de acumulação de Cu, contrariamente ao de Cd, foi mais depende da exposição do que dos tecidos analisados (Tabela 8.1). Na exposição à concentração mais baixa (25 $\mu\text{g l}^{-1}$) todos os tecidos acumularam o Cu linearmente com o tempo, enquanto que na exposição a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ a acumulação de Cu seguiu o modelo cinético de 1ª ordem. Isto revela que na exposição mais elevada existe uma limitação da taxa de difusão deste metal para o interior da célula e/ou da saturação do sistema de ligandos. Por outro lado, na exposição à mistura metálica, apesar de ter sido utilizada a mesma concentração de Cu (50 $\mu\text{g l}^{-1}$), os diferentes tecidos acumularam linearmente os teores de Cu, mostrando que neste caso a interferência dos outros metais levou a um aumento da indução de ligandos (MT) no meio intracelular.

A distribuição subcelular de Cu nas brânquias e na glândula digestiva, tal como o Cd, mostrou que a maior quantidade deste elemento se encontra associado à fracção FBPM, na qual se encontra a MT. Por outro lado, na restante parte edível a maior quantidade deste elemento encontra-se associado à fracção FI. No entanto, em todos os tecidos o aumento dos teores de Cu foi acompanhado por um aumento da

concentração de MT. A ligação de Cu a esta proteína foi demonstrada recorrendo à cromatografia de filtração com gel, através da qual foi possível separar os vários componentes da fracção subcelular FBPM. A resposta polarográfica foi máxima nas fracções onde eluiu a maior quantidade de Cu, mostrando a associação deste elemento à MT.

O aumento dos níveis de MT medidos na fracção subcelular FBPM das amêijoas expostas a Cu, contrariamente ao que sucedeu nas expostas ao Cd, é menos dependente dos tecidos, da concentração de exposição e da forma de exposição (singular/mistura). Os níveis desta proteína no final do período de exposição aumentaram para cerca do triplo nas brânquias em todas as exposições, enquanto que, na glândula digestiva e na restante parte edível os teores de MT aumentaram para cerca do dobro nas exposições a 25 e 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ e para o triplo na exposição polimetálica.

O padrão de acumulação de Zn (Capítulo V), tal como aconteceu para o Cu, foi dependente da exposição, sendo semelhante nos tecidos para cada uma das exposições (Tabela 8.1). Na exposição às concentrações mais baixas, quer na forma individual (100 $\mu\text{g l}^{-1}$) quer em conjugação (50 $\mu\text{g l}^{-1}$ Zn + 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cu + 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd), os tecidos não acumularam os teores de Zn com um padrão definido, à exceção das brânquias e da restante parte edível nas amêijoas expostas a 100 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ em que os níveis aumentaram nos primeiros 7 dias de exposição mantendo-se constantes no restante período de exposição. Por outro lado, na exposição mais elevada (1000 $\mu\text{g l}^{-1}$), todos os tecidos acumularam exponencialmente este metal.

Contrariamente à distribuição subcelular de Cd e Cu, a distribuição subcelular de Zn nos tecidos de *R. decussatus*, mostrou que a maior quantidade deste elemento se encontra associado à fracção insolúvel (FI). No entanto, nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas expostas a 1000 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ a percentagem de Zn associado à fracção subcelular FBPM aumentou relativamente aos mesmos tecidos das amêijoas não contaminadas. Nestes tecidos o aumento de Zn na fracção FBPM foi acompanhado por um aumento da indução da síntese de MT. Tal como com o Cu, a ligação de Zn à MT foi demonstrada recorrendo à cromatografia de filtração com gel, sendo a resposta polarográfica máxima nas fracções onde eluiu a maior quantidade de Zn, mostrando a associação deste elemento à MT.

O aumento dos níveis de MT medidos na fracção subcelular FBPM das amêijoas expostas a Zn, tal como sucedeu nas expostas ao Cd, dependeu dos tecidos, da concentração de exposição e da forma de exposição (singular/mistura). Na exposição singular, os níveis desta proteína só foram induzidos nas brânquias e na restante parte edível das amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$, os teores desta proteína triplicaram nas brânquias e duplicaram na restante parte edível. No entanto, tal como referido anteriormente o incremento dos níveis de MT foi superior nos diferentes tecidos das amêijoas expostas à mistura metálica (Capítulo VI).

De uma forma geral, verificou-se que entre os três metais, o Zn corresponde ao metal com a menor capacidade de induzir a síntese de MT. Por outro lado, a comparação da inducibilidade de MT pelo Cd e Cu, considerando exposições semelhantes em termos quantitativos ($40 \mu\text{g Cd l}^{-1} - 356 \text{ nmol l}^{-1}$ e $25 \mu\text{g Cu l}^{-1} - 393 \text{ nmol l}^{-1}$), verificou-se que ao fim de 40 dias de exposição os níveis desta proteína foram superiores nos tecidos das amêijoas expostas ao Cu. Assim, *a inducibilidade de MTs nos tecidos de R. decussatus variou da seguinte forma: Cu > Cd > Zn.*

Dos resultados obtidos nos Capítulos III, IV e V também se verifica que existem importantes diferenças na cinética de eliminação destes metais, nos tecidos da amêijoia. Enquanto, que a concentração de Cd dificilmente é eliminada nos tecidos de *R. decussatus*, o Zn é rapidamente eliminado, mas com uma velocidade inferior à do outro metal essencial (Cu). Estes resultados mostram que os metais essenciais são mais rapidamente eliminados que os metais não-essenciais.

A eliminação de Cd depende dos tecidos da amêijoia e da concentração de Cd a que os organismos foram pré-expostos (Capítulo III). De uma forma geral, o tempo de meia vida de Cd foi superior na glândula digestiva, enquanto o tempo de meia vida calculado para a MT foi superior nas brânquias relativamente aos outros tecidos (Tabela 8.2), o que parece reflectir uma permanência de Cd na glândula digestiva mais longa, apesar da MT apresentar uma taxa de degradação superior. Isto pode ser explicado pelos níveis destas proteínas serem significativamente mais elevados neste tecido e/ou pela reciclagem de formação do complexo MT-Cd.

Por outro lado, o Cd foi eliminado mais lentamente nos tecidos das amêijoas expostas à menor concentração de Cd (Tabela 8.2). Em paralelo com a eliminação de Cd, foi observada uma degradação de MT inversamente proporcional ao tempo de meia vida deste elemento, ou seja, o $t_{1/2}$ de MT foi superior nos tecidos das amêijoas pré-expostas à concentração mais elevada (Tabela 8.2). Estas observações, tal como sugerido por Langston *et al.* (1998), parecem mostrar que, para concentrações mais elevadas, a permanência de Cd possa estar relacionada com uma reciclagem do complexo MT-Cd, em que o Cd libertado induz novamente a síntese de MT.

O tempo de meia vida da MT foi menor comparativamente com o tempo de meia vida do Cd em cada um dos tecidos e nas diferentes exposições (Tabela 8.2), sugerindo que a degradação e a regeneração de MT mantem teores elevados desta proteína, para impedir que o ião Cd livre interfira no metabolismo destes tecidos e assim funcionando como mecanismo de desintoxicação deste metal.

Tabela 8.2 – Comparação entre os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) de cada metal e de MT durante o período de depuração de 50 dias, nos diferentes tecidos das amêijoas.

	Exposição a Cd				Exposição a Cu				Exposição ao Zn			
	4 $\mu\text{g l}^{-1}$		40 $\mu\text{g l}^{-1}$		25 $\mu\text{g l}^{-1}$		50 $\mu\text{g l}^{-1}$		100 $\mu\text{g l}^{-1}$		1000 $\mu\text{g l}^{-1}$	
	Cd	MT	Cd	MT	Cu	MT	Cu	MT	Zn	MT	Zn	MT
Brânquias	49	20	45	30	6	18	(b)	(b)	15	(a)	21	19
Gl. Digestiva	78	14	55	22	5	20	(b)	(b)	15	(a)	19	(a)
Resto	30	9	(a)	18	12	16	(b)	(b)	(a)	(a)	(a)	18

(a) os teores não decresceram; (b) não existem dados.

Durante o período de depuração, a concentração de Cu e Zn decresceu consideravelmente (>70%) nos tecidos de *R. decussatus*, à excepção dos teores de Zn na restante parte edível. Em paralelo com a depuração destes metais foi observada uma rápida diminuição de MT, principalmente nos tecidos das amêijoas pré-expostas a Cu (Tabela 8.2).

De uma forma geral, verificou-se que o tempo de meia de Cd nos tecidos de *R. decussatus* foi superior ao tempo de meia vida estimado para os metais essenciais (Cu

e Zn) e o tempo de meia vida da MT nos mesmos tecidos foi inferior ao calculado para os metais, à excepção do Cu que apresentou o tempo de meia vida mais curto ($t_{1/2} \text{ Cd} > t_{1/2} \text{ Zn} > t_{1/2} \text{ MT} > t_{1/2} \text{ Cu}$) (Tabela 8.2). Resultados similares foram detectados na ostra *C. gigas*, com tempos de meia vida estimados em 300 dias no caso do Cd, 60 dias no Zn, 10 dias no Cu e 25 dias no caso da MT (Cosson, 2000).

As diferentes cinéticas de eliminação de cada um dos metais, podem ser explicadas em parte pela rápida degradação dos complexos de MT formados com Cu e Zn, comparativamente com os de Cd, sendo estes complexos mais estáveis. No caso de Cu a ligação com MT (Cu-MT), forma um complexo o qual é rapidamente transferido para os lisossomas e posteriormente eliminado do organismo, apresentando por isso um tempo de meia vida relativamente mais pequeno comparativamente com os outros metais. No caso do Zn, também se observa uma rápida degradação de proteínas complexadas com este metal (que além das MTs, podem ser pequenos peptídeos, glutatona, aminoácidos e proteínas de elevado peso molecular, como apontado por Baudrimont *et al.* (2003)). Resultados semelhantes suportando esta hipótese, foram descritos para o mexilhão *M. edulis* para o Cd e Cu (Viarengo, 1989; Maroni, 1990) e para a amêijoia asiática *C. fluminea* no caso do Zn e também do Cd (Baudrimont *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam o papel das MTs em processos de eliminação de Cu e Zn e explicam a permanência de Cd nos tecidos de R. decussatus.

8.3. APLICAÇÃO DA MT NUMA POPULAÇÃO NATURAL DE AMÊJOAS *R. decussatus* NA RIA FORMOSA

No final deste trabalho (Capítulo VII) ao aplicar os conhecimentos adquiridos a uma população natural de *R. decussatus*, de forma a generalizar e concluir sobre a utilização desta proteína como biomarcador, em que o local seleccionado foi a Ria Formosa, verificou-se que apesar dos resultados dos estudos laboratoriais terem mostrado que o Cu apresenta a maior capacidade de induzir a síntese de MT, esta

relação não se verificou no campo. De facto, o modelo que descreveu a relação entre a MT, metais e peso nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível das amêijoas recolhidas em diferentes locais da Ria Formosa, mostrou que o Cd foi o único metal que influenciou a síntese de MT em todos os tecidos das amêijoas recolhidas neste sistema lagunar. Verificando-se que, a variação espacial e sazonal da concentração de metais e MT nas brânquias e glândula digestiva da amêijoia *R. decussatus* está relacionada com a diferente biodisponibilidade ambiental de Cd. Apesar de noutros trabalhos de campo os níveis de MT na glândula digestiva da *R. decussatus* poderem estar relacionados com as concentrações de Cu e Zn (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999, 2000), os níveis destes dois metais presentes na Ria Formosa não induziram claramente a MT nesta espécie e neste local, mostrando neste caso que, os níveis de MT resultam de um equilíbrio entre os processos de síntese e de degradação da própria proteína. Mesmo que os processos fisiológicos de desintoxicação sejam activados devido à exposição a Cu ou a Zn, este aumento de actividade pode não resultar obrigatoriamente num aumento da concentração de MT.

De uma forma geral, constatou-se que no estudo de campo a concentração de MT resulta de uma resposta à exposição ao Cd, particularmente nas brânquias e na glândula digestiva onde esta proteína pode ser utilizada como um indicador precoce de exposição ao Cd e um biomarcador útil para aceder ao estado toxicológico nesta população de amêijoia da Ria Formosa.

8.4. CONCLUSÕES

Para concluir acerca da utilização da metalotionina como biomarcador na amêijoia *R. decussatus* é necessário ter em consideração alguns aspectos importantes decorrentes dos resultados deste trabalho:

- (i) Este estudo revelou a possibilidade de controlar as variações intra e inter-específicas da variabilidade da indução da metalotionina na amêijoia *R. decussatus*, em que os factores bióticos e abióticos, apesar de serem apontados como fontes de variabilidade desta proteína, nesta espécie a concentração metálica aparece como o factor determinante que afecta a síntese de MT.
- (ii) Os resultados deste trabalho mostraram que a indução da síntese de MT apresenta uma grande especificidade para os metais, principalmente para o Cd e Cu, sendo estes metais os principais indutores desta proteína.
- (iii) A capacidade desta proteína de responder precocemente a um estado de contaminação difere entre os metais:
 - No caso do Cd essa capacidade foi demonstrada, pois mesmo em concentrações baixas e ambientalmente realistas deste elemento, a MT foi induzida nos diferentes tecidos de *R. decussatus*. Sendo a indução depende do tecido (Brânquias» Glândula digestiva» Restante parte edível);
 - No caso da exposição ao Cu, apesar da resposta desta proteína depender do tempo e da concentração de exposição, a rápida eliminação do complexo MT-Cu em todos os tecidos, limita a sua utilização como biomarcador.
 - Por último, a resposta da MT em função da exposição a Zn, revela que esta proteína não deverá ser utilizada com marcador deste tipo de contaminação, uma vez que só existe indução desta proteína por concentrações ambientalmente irrealistas deste elemento. Desta forma, quando se pretende utilizar a MT como biomarcador em zonas costeiras, onde ocorrem uma vasta gama de concentrações deste elemento a resposta desta proteína não reflecte as concentrações de Zn.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abbe, G.R., Riedel, G.F. & Sanders, J.G., 2000. Factors that influence the accumulation of copper and cadmium by transplanted eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Patuxent River, Maryland. *Marine Environmental Research*, **49**: 377-396.
- Ahsanullah, M. & Williams, A.R., 1991. Sublethal effects and bioaccumulation of cadmium, chromium, copper, and zinc in the marine amphipod *Allorchestes compressa*. *Marine Biology*, **108**: 59-65.
- Al-Farawati, R. & van den Berg, C.M.G., 1999. Metal-sulfide complexation in seawater. *Marine Chemistry*, **63**: 331-352.
- Allen, A.G., M. Radojevic, and R.M. Harrison. 1988. Atmospheric speciation and wet deposition of alkyllead compounds. *Environmental Science & Technology*, **22**: 517-522.
- Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Grimme, L.H., 1993. Aquatic toxicology, analysis of combination effects. In: Corn, M (Ed.), *Handbook of Hazardous Materials*, pp. 15-27. Academic Press, San Diego.
- Amdurer, M. Adler, D. & Santachi, P.H., 1983. Studies of the chemical forms of trace elements in sea water using radiotracers. In: C.S. Wong, E. Boyle, K.W. Bruland, J.D. Burton, and E.D. Goldberg (Eds.). *Trace Metals in Sea Water*, pp. 537-562. Plenum Press, New York.
- Amiard, J.C. & Berthet, B., 1996. Fluctuations of cadmium, copper, lead and zinc concentration in field populations of pacific oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Bourgneuf (Atlantic coast, France). *Annales Institute Oceanographia, Paris*, **72**(2): 195-207.
- Amiard, J.C. & Cosson R., 1997. Les métallothionéines. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (Eds.). *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, pp. 53-66. Masson. Paris.
- Amiard-Triquet, C. & Amiard, J.C., 1998. Influence of ecological factors on accumulation of metal mixtures. In: Langston W.J., Bebianno M.J. (Eds.). *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, pp. 351-386. Chapman & Hall. London.
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B. & Martoja, R., 1991. Influence of salinity on trace metal (Cu, Zn, Ag) accumulation at the molecular, cellular and organism level in the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *BioMetals*, **4**: 144-150.
- Amiard, J.C., Geffard, A. & Amiard-Triquet, C., 1998. La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution métallique: variabilité entre sites, saisons et organismes. *Journal de Recherche Oceanographique*, **23**: 25-30.
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Metayer, C. & Amiard, J.C., 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis* L. II. Experimental study. *Marine Biology*, **92**: 7-13.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B. & Métayer, C., 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **106**: 73-89.

- Amiard, J.C., Métayer, C., Baud, J.P. & Ribeyre, F., 1994. Influence of some ecological and biological factors on the bioaccumulation in young oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) during their spat rearing. *Water Research*, **28**(1): 219-231.
- Amiard-Triquet, C., 1989. Bioaccumulations et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines. *Bulletin d'Ecologie*, **20**(2): 129-151.
- Amiard-Triquet, C., Altmann, S., Amiard, J.C., Ballan-Dufrançais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Carrigues, P., His, E., Jeantet, A.Y., Menasria, R., Mora, P., Mouneyrac, C., Narbonne, J.F. & Pavillon, J.F., 1998a. Fate and effects of micropolluants in the Gironde estuary, fr: A multidisciplinary approach, *Hydrobiologia*, **373/374**: 259-279.
- Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Larroux, C., Regoli, F. & Hummel, H., 1998b. Metallothioneins in arctic bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**: 96-102.
- Anandraj, A., Marshall, D.J., Gregory, M. A. & McClurg, T.P., 2002. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, **132**(3): 355-363.
- Andersen, R.D., Piletz, J.E., Birren, B.W. & Herschman, H.R., 1983. Levels of metallothionein messenger RNA in foetal, neonatal and maternal rat liver. *European Journal of Biochemistry*, **131**(3): 497-500.
- Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Layouche, C. & Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(11): 2462-2471.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, **59**: 95-104.
- Arnaud, J. & Favier, A., 1989. Le zinc. In: Chappuis, (Ed.), *Les Oligoéléments en Médecine et Biologie*, pp.347-368. Lavoisier Tec & Doc, Paris, Editions Médicales Internationales, Cachan.

B

- Baldwin, I.G. & Kramer, K.J.M., 1994. Biological Early Warning Systems (BEWS). In: Kramer KJM (Ed.). *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, pp. 1-23. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Baruthio, F., 1991. Toxicologie des éléments trace essentiels. In: Chappuis (Ed.). *Les oligoéléments en médecine et biologie*, pp. 214-387. Lavoisier Tec & Doc, Paris & Editions Médicales Internationales, Cachan.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony S., Ribeyre, J., métivaud, J. & Boudou, A., 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **118**(3): 361-367.

- Baudrimont, M., Andr s, S., Durrieu, G. & Boudou, A., 2003. The key role of metallothionein in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology*, **63**(2): 89-102.
- Bebianno, M.J., 1995. Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon. *The Science of Total Environment*, **171**: 107-115
- Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 1989. Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portuguese Electrochimica Acta*, **7**: 59-64.
- Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Marine Biology*, **108**: 91-96.
- Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **103C**: 79-85.
- Bebianno, J.M. & Langston, W.J., 1993. Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *BioMetals*, **6**: 239-244.
- Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 1995. Induction of metallothionein synthesis on the gill and kidney of *Littorina littorea* exposed to cadmium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **75**: 173-186.
- Bebianno, M.J. & Machado, L., 1997. Concentration of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Portuguese Coast. *Marine Pollution Bulletin*, **34**: 666-671.
- Bebianno, M.J. & Serafim, M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of bivalves molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *The Science of Total Environment*, **214**: 123-131.
- Bebianno, M.J. & Serafim, M.A., 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 53-66.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J. & Simkiss, K., 1992. Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**: 329-342
- Bebianno, M.J., Nott, J.A. & Langston, W.J., 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology*, **27**: 315-334.
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A. & Rita, M.F., 1994. Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**: 726-732.
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A. & Simes, D., 2000. Metallothioneins in the clam *Ruditapes decussatus*: an overview. *Analisis*, **28**(5): 386-390.
- Bebianno, M.J., Cravo, Miguel, C. & Morais, S., 2002. Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *The Science of the Total Environment*, **301**(1-3): 151-61.

- Beeby, A., 1991. Toxic metal uptake and essential metal regulation in terrestrial invertebrates. *In*: Newman, M.C. & McIntosh, A.W. (Eds.), *Metal ecotoxicology: concepts & applications*, pp. 65-89. Lewis Publishers, Michigan, USA.
- Berg, J.W., 1990. Zinc-finger domains: hypothesis and current knowledge. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **19**: 405-21.
- Berthet, B., 1990. Influence de la voie de contamination sur les formes physico-chimique de l'argent chez *Crassostrea gigas* Thunberg. *Océanis*, **16**(5): 349-357.
- Bertini, I., Hartman, H.J., Klein, T., Gaohua, I., Luchinat, C. & Weser, U., 2000. Structure of Cu₇ metallothionein. *European Journal of Biochemistry*, **267**: 1008-1018.
- Binz, P.A. & Kägi, J.H.R., 1999. Metallothionein: Molecular evolution and classification. *In*: Klassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*, pp. 7-13. Birkhäuser Verlag, Basel, Basel.
- Bishop, P.L., 1983. *Marine Pollution and its Control*, 357p. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Bjerregaard, P., 1988. Effect of selenium on cadmium uptake in selected benthic invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, **48**: 17-23.
- Bjerregaard, P. & Depledge, M.H., 1994. Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentration. *Marine Biology*, **119**: 385-395.
- Blasco, J. & Puppo, J., 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **122**(C): 253-263.
- Bordin, G., McCourt, J., Cordeiro Raposo F. & Rodriguez, A.R., 1997. Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. *Marine Biology*, **129**: 453-463.
- Boudou, A., Delnomdedieu, M., Georgescauld, D., Ribeyre, F., & Saouter, E., 1991. Fundamental roles of biological barriers in mercury accumulation and transfer in freshwater ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, **56**: 453-463.
- Bremner, I., 1991. Nutritional and physiologic significance of metallothionein. *Methods in Enzymology*, **205**: 25-35.
- Brouwer, M. & Brouwer-Hoexum, T., 1991. Interaction of copper-metallothionein from American lobster, *Homarus americanus*, with glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **290**(1): 207-213.
- Brouwer, M., Schlenk, D., Ringwood, A.H. & Brouwer-Hoexum, T., 1992. Metal-specific induction of metallothionein isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single and mixed-metal exposure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **294**(2): 461-468.
- Brouwer, M., Engbild, J., Brouwer-Hoexum, T. & Truncali, A., 1995. Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (*Callinectes sapidus*) metallothionein isoforms. *The Biochemical Journal*, **311**: 617-622.

Brown, M.T. & Depledge, M.H., 1998. In: Langston, W.J. & Bebianno, M.J. (Eds.). *Determinants of trace metal concentration in marine organisms*, pp. 185-217. Chapman & Hall, London.

Bruland, K.W., Orians, K.J. & Cowen, J.P., 1994. Reactive trace in the stratified central North Pacific. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **58**: 3171-3182.

Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G. & Burt, G.R. 1985. A guide to the assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, Occasional publication, **4**, 92p.

Brzóska, M.M. & Moniuszko-Jakoniuk, J., 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology*, **39**: 967-980.

Burton, D.T. & Fisher, D.J., 1990. Acute toxicity of cadmium, copper, zinc, ammonia, 3,3'-dichlorobenzidine, 2,6-dichloro-4-nitroaniline, methylene chloride, and 2,4,6-trichlorophenol to juvenile grass shrimp and killifish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 776-783.

C

Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Malatesta, M., Gazzanelli, G. & Gallo, G., 1999. Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) through tyrosine kinase mediated signal transduction. *General and Comparative Endocrinology*, **116**(2): 241-248.

Canli, M. & Furness, R.W., 1993. Toxicity of heavy metals dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Marine Environmental Research*, **36**: 217-236.

Carpene, E. & George, S., 1981. Absorption of cadmium by gills of *Mytilus edulis* (L.). *Molecular Physiology*, **1**: 23-34.

Casterline, J.L. & Yip, G., 1975. The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean and rat liver and kidney. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **3**: 319-329.

Castro, L., Carmo, C., Peres, I. & Pihan, J.C., 1996. The clam, *Ruditapes decussatus* L., as a pollution bioindicator: zinc and lead accumulation and depuration. *Ecology*, **27**(4): 263-268.

Chan, H.M., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Marine Ecology Progress Series*, **48**: 295-303.

Chan, K.W., Cheung, R.Y.H., Leung, S.F. & Wong, M.H., 1999. Depuration of metals from soft tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted from a contaminated site to clean sites. *Environmental Pollution*, **105**: 299-310.

Chan, J., Huang, Z., Merrifield, M.E., Salgado, M.T. & Stillman, M.J., 2002. Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modelling techniques. *Coordination Chemistry Reviews*, **233-234**: 319-339.

- Chang, S.I. & Reinfelder, J.R., 2000. Bioaccumulation, subcellular distribution, and trophic transfer of copper in a coastal marine diatom. *Environmental Science & Technology*, **34**: 4931-4935.
- Chang, M.-H., Lin, H.-C. & Hwang, P.-P., 1997. Ca^{2+} uptake and Cd^{2+} accumulation in larval tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to waterborne Cd^{2+} . *American Journal of Physiology*, **274**: R1570-R1577.
- Chelomin, V.P., Bobkova, E.A., Lukyanova, O.N. & Chekmasova, N.M., 1995. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **110(C)**: 329-335.
- Cherian, M.G. and ILM. Chan., 1993. Biological functions of metallothionein - a review. In: *Metallothionein III*, Suzuki, K.T., N. Imura, and M. Kimura (Eds.), pp. 87-109. Birkhauser Verlag, Basel,
- Cheung, S.G. & Wong, L.S., 1998. Physiological responses of the subtidal prosobranch, *Babylonia lutosa* (Gastropoda: Baccinidae) to copper. *The Science of the Total Environment*, **214**: 185-191.
- Choi, H.J., Ahn, I.Y., Ryu, S.K., Lee, Y.S., Lee, I.S. & Jeong, K.H., 2001. Preliminary evidence for a metallothionein-like Cd-binding protein in the kidney of the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Ocean and Polar Research*, **23(4)**: 337-345.
- Chong, K. & Wang, W.-X., 2001. Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr, and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Pollution*, **115(1)**: 107-121.
- Chubatsu, L.S. & Meneghini R. 1993. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochemical Journal*, **291**: 193-198.
- Clark, R.B., 2001. Marine Pollution. 5th Edition. Oxford University Press Inc, New York. 236 pp.
- Connors, D.E. & Ringwood, A.H., 2000. Effects of glutathione on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Toxicology*, **50**: 341-349.
- Cooper R.J., Langlois D. & Olley J., 1982. Heavy metals in Tasmanian shellfish. 1. Monitoring heavy metal contamination in the Derwent estuary: use of oyster and mussels. *Journal of Applied Toxicology*, **2**: 99-109.
- Cortêsão, C., Mendes, R. & Vale, C., 1986. Metais pesados em bivalves e sedimentos na Ria Formosa, Algarve. *Boletim do Instituto Nacional de Investigação das Pescas*, **14**: 3-28.
- Cosson, R.P., 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cellular and Molecular Biology*, **46(2)**: 295-309.
- Cosson, R.P. & Amiard, J.C., 2000. Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (Eds.). *Use of biomarkers for environmental quality assessment*, pp. 79-111. Science Publishers Enfield, NH, USA.

Coton, E., Vagias, C., Rapti, T. & Roussis, V., 2001. Metallothionein levels in the bivalves *Callista chione* and *venus verrucosa* from two mediterranean sites. *Zeitschrift für Naturforschung*, **56C**: 848-852.

Couillard, Y., Campbell, P.J.C. & Tessier, A., 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnology and Oceanography*, **38**: 299-313

Couillard, Y., Campbell, P.J.C. & Tessier, A., Pellerin-Massicote, J. & Auclair, J.C. 1995a. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Phygadon grandis*, across a metal contamination gradient. I: Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu and Zn) concentration in soft tissues. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**: 690-702.

Couillard, Y., Campbell, P.J.C. & Tessier, A., Pellerin-Massicote, J. & Auclair, J.C. 1995b. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Phygadon grandis*, across a metal contamination gradient. II: Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects higher levels of biological organization. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**: 703-715.

Cunningham, P.A., 1979. The use of bivalve molluscs in heavy metal pollution research. In: Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P. & Vernberg, F.J. (Eds.). *Marine Pollution: Functional Responses*, pp.183-221. Academic Press, New York.

D

da Silva, J.J.R.F. & Williams, R.J.P., 2001. The Biological Chemistry of the Elements - The Inorganic Chemistry of Life. pp. 575, 2nd Edition. Oxford University Press Inc, New York.

De Boeck, G., Ngo, T.T.H., Campenhout, K.V. & Blust, R., 2003. Differential metallothionein induction patterns in the three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology*, **65**: 413-424.

Degraeve, N., 1981. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research/ Reviews in Genetic Toxicology*, **86(1)**: 115-135.

Den Besten, P.J., Bosma, P.T., Herwig, H.J., Zandee, D.L. & Voogt, P.A., 1991. Effects of cadmium on metal composition and adenylate energy charge in the sea star *Asterias rubens* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**:112-117.

Depledge, M.H. & Rainbow, P.S., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **97C(1)**: 1-7.

Desbos, L., 1999. Etude de la contamination par les métaux (Cd, Cu, Zn) d'un mollusque bivalve estuarien (*Mya arenaria*) en fonction de paramètres naturels et anthropiques. Relation avec un biomarqueur d'exposition: la métallothionéine. Rapport de DEA, Metz. 50p.

Dethloff, M.G., Schlenk, D., Hamm, J.T. & Bailey, H.C., 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **42**: 253-264.

- Di Giulio, R., Benson, W., Sanders, B. & Van Veld, P., 1995. Biochemical mechanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicity. Rand, G.M. (Ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 17: 523-525, 2nd Edition. Taylor & Francis, USA.
- Dieter, H.H., Muller, L., Abek, J. & Summer, K.H., 1987. Metallothionein in biological materials: interlaboratory comparison of 5 current methods. In: Käji, J.H.R. & Kojima, Y. (Eds.) *Metallothionein II*, pp.351-358, Birkhauser, Basel.
- Donker, M.H., Raedecker, M.H. & van Straalen, N.M., 1996. The role of zinc regulation in the zinc tolerance mechanism of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Journal of Applied Ecology*, 33: 955-964.
- Dorronsoro, C., Martin, F., Garcia, I., Simon, M., Fernandez, F., Aguilar, J., Fernandez, J., 2002. Migration of trace elements from pyrite tailings in carbonate soils. *Journal of Environmental Quality*, 31: 829-835.
- Dunn, M., Blalock, T.L. & Cousins R.J., 1997. Minireview: Metallothionein. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 185: 107-119.
- Dusquesne, S., Flowers A. E. & Coll, J.C., 1995. Preliminary evidence for metallothionein-like heavy metal-binding protein in tropical marine bivalve *Tridacna crocea*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 112C(1): 69-78.
- E**
- Earnshaw, M.J., Wilson, S., Akberali, H.B., Butler, R.D. & Marriott, K.R.M., 1986. The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) - III. The effect of applied copper and zinc on sperm motility in relation to ultrastructural damage and intracellular metal localisation. *Marine Environmental Research*, 20(4): 261-278.
- Eisler, R., 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Biological Report, 85: 1-2. Contaminant Reviews. Report n° 2. U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C. 46 pp.
- Elinder, C.G. & Järup, L., 1996. Cadmium exposure and health risks: recent findings. *Ambio*, 25: 370-373.
- Elliot, N.G., Swain, R.S. & Ritz, D.A., 1986. Metal interaction during accumulation by the mussel *Mytilus edulis planulatus*. *Marine Biology*, 93: 395-399.
- Engel, D.W., 1999. Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the american oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 47: 89-102.
- Engel, D.W. & Fowler, B. A., 1979. Factors influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms. *Environmental Health Perspectives*, 28: 81-88.
- Engel, D.W. & Brouwer, M., 1989. Metallothionein and metallothionein-like proteins: physiological importance. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 5: 53-75.
- EPA (U.S. Environmental protection Agency), 1992. Quality Criteria for Water 1992. U.S. EPA, Office of Water, Criteria and standards Division, Washington, D.C.

EPA Region III (U.S. environmental protection Agency, Region III), 2000. Risk-Based Concentration Table, April 13, 2000. U.S. EPA, Region III, Philadelphia, PA.

Ettajani, IL, Amiard-Triquet, C. & Amiard, J.C., 1992. Etude expérimentale du transfert de deux éléments traces (Ag, Cu) dans une chaîne trophique marine: eau-particules (sédiments naturel, microalgues)-mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *Water, Air, and Soil Pollution*, **65**: 215-236.

Ettxeberria, M.I., Sastre, I., Cajaraville, M.P. & Marigómez, L., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from a zinc polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **3**: 338-345.

Everaerts, J.M., 1990. Uptake and release of Cd in various organs of the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **45**: 560-567.

F

Falcão, M. & Vale, C., 1998. Sediment-water exchanges of ammonium and phosphate in intertidal and subtidal areas of a mesotidal coastal lagoon (Ria Formosa). *Hydrobiologia*, **373/374**: 193-201.

Farrel, R.E., Germida, J.J. & Huang, P.M., 1990. Biototoxicity of mercury as influenced by mercury (II) speciation. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 3006-3016.

Filho, G.M.A., Karez, C.S., Andrade, L.R., Yoneshigue-Valentin, Y. & Pfeiffer, W.C., 1997. Effects on growth and accumulation of zinc in six seaweed species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **37**: 223-228.

Fowler, B.A., Hildebrand, Y. & Webb, M., 1987. Nomenclature of metallothionein. In: Kagi, J.H.R. & Kojima, Y. (Eds.). *Metallothionein II*, pp.755, Birkhäuser Verlag, Basel.

Frazier, J.M., 1979. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Environmental Health Perspectives*, **28**: 75-79.

Frazier, J.M. & George, S.G., 1983. Cadmium kinetics in oysters – a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **76**: 55-61.

G

Garvey, J.S., 1990. Metallothionein: a potential biomonitor of exposure to environmental toxins. In: Mc Carthy, J.F. et Shugart L.R. (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*, pp 267-287, Lewis Publishers, CRC Press Inc., Boca Raton.

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C. & Mouneyrac, C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers*, **6**(2): 91-107.

Geffard, A., Amiard, J.C. & Amiard-Triquet, C., 2002a. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*, **7**(2): 123-137.

- Geffard, A., Amiard, J.C. & Amiard-Triquet, C., 2002b. Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **131**(C): 281-293.
- George, S.G., 1982. Subcellular accumulation and detoxification of metals in aquatic animals. *In*: Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thuenberg, F. & Vernberg, F.J., (Eds.). *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*, pp. 1-60. New York Academic Press.
- George, S.G., 1990. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. *In*: Furness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.). *Heavy Metals in the Marine Environment*, pp. 123-142, CRC Press Inc, Boca Raton, Florida,.
- George, S.G. & Pirie, B.J.S., 1980. Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L.): A combined ultrastructural and biochemical study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **60**: 575-590.
- George, S.G. & Viarengo, A., 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussels. *In*: Vernberg, J., Thurberg, F., Calabrese, A., Vernberg, W., (Eds.). *Marine Pollution and Physiology: Recent Advances*, pp.125-143. University of South Carolina Press.
- George, S.G. & Olsson, P.E., 1994. Metallothionein as indicator of trace pollution. *In*: Kramer, K.J.M. (Ed.). *Biological monitoring of coastal waters and estuaries*, pp.151-178. CRC Press, Boca Raton, FL, USA,
- George, S.G., Pirie, B.J.S. & Coombs, T.L., 1975. Absorption, accumulation and excretion of iron-protein complexes by *Mytilus edulis* (L.). Int. Conf. Heavy Metal. Envir. T.C. Hutchinson (Ed.), pp. 887-900. University of Toronto. Toronto, Canada,
- George, S.G., Carpené, E. & Coombs, T.L., 1978. The effect of salinity on the uptake of cadmium by the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). *In*: McLusky, D.S. & Berry, A.J. (Eds.). *Physiology and Behaviour of Marine Organisms*, pp 189-193. Pergamon Press,.
- George, S.G., Pirie, B.J.S., & Frazier J.M., 1983. Effects of cadmium exposure on metal-containing amoebocytes of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **76**: 63-66.
- George, S.G., Carpené, E., Coombs, T.L., Overnell, J. & Youngston, A., 1979. Characterisation of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L.) exposed to cadmium. *Biochimica et Biophysica Acta*, **580**: 225-233.
- Géret, F., 2000. Synthèse de métallothionéine chez deux bivalves (l'huître et la moule) en réponse à une contamination métallique par la voie directe et par la voie trophique. Thèse de Doctorat. Université de Nantes. 307p.
- Géret, F. & Bebianno, M.J., 2004. Does zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**(3): 399-409.
- Géret, F., Serafim, A., Barreira, L. & Bebianno, M.J., 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*, *Marine Environmental Research*, **54**: 413-417.

- Gerpe, M., Kling, P., Berg, A.H. & Olsson, P.E., 2000. Artic char (*Salvelinus alpinus*) metallothionein: cDNA sequence, expression, and tissue-specific inhibition of cadmium-mediated metallothionein induction by 17- β -estradiol, 4-OH-PCP 30 and PCB 104. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**: 638-645.
- Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perce, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B. & Pellerin, J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, **64**: 185-200.
- Gnassia-Barelli, M., Roméo, M. & Puiseux-dao, S., 1995. Effects of cadmium and copper contamination on calcium content of the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*, **35**(1,2): 53-57.
- Goering, P.L. & Klaassen, C.D., 1983. Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **70**: 195-203.
- Gould, E. Thompson, R.J., Buckley, B.J., Rusanowsky, D. & Sennefelder, G.R., 1988. Uptake and effects of copper and cadmium in the gonad of the scallop *Placopecten magellanicus* concurrent metal exposure. *Marine Biology*, **97**:217-223.
- Griffith, B.B., Walters, R. A., Enger, M.D., Hildebrand, C.E. Griffith, J.K. 1983. cDNA cloning and nucleotide sequence comparison of Chinese hamster metallothionein I and II mRNAs. *Nucleic Acids Research*, **11**(3): 901-10.
- Guelorget, O. & Perthuisot, J.P., 1984. Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paraliq. *Bulletin d'Ecologie*, **15**: 67-76.
- Guelorget, O., Mayere, C., Amanieu, M., 1980. Croissance, biomasse et production de *Venerupis decussata* et *Venerupis aurea* dans une lagune méditerranéenne, l'étang du Prevost a Palavas (Herault, France). *Vie Mar*, **2**: 25-38.
- Gutknecht, J., 1981. Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *The Journal of Membrane Biology*, **61**: 61-66.
- Gundacker, C., 2000. Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. *Environmental Pollution*, **110**(1): 61-71.

H

- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T. & Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiscus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*, **51**: 247-264.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Molecular Aspects of Medicine*, **8**: 89-193.
- Hamilton, S.J. & Merle, P.M., 1986. Metallothionein in fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Transactions of the American Fisheries Society*, **115**: 596-609.

- Hamza-Chaffai, A., Roméo, M. & Gnassia-Barelli, M., 1998. Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **61**: 397-404.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C. & Cosson, R.P., 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **123C**: 153-163.
- Hamza-Chaffai, A., Cosson, R.P., Amiard-Triquet, C. & El Abed, A., 1995. Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **111C**(2): 329-341.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L. & Berthet, B., 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **127C**: 185-197.
- Hathout, Y., Fabris, D. & Fenselau, C., 2001. Stoichiometry in zinc ion transfer from metallothionein to zinc finger peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, **204**: 1-6.
- Hemelraad, J., Kleinveld, H.A., De Roos, A.M., Holwerda, D. & Zandee, D.I., 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effects of Zn on uptake and distribution of Cd in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **16**: 95-101.
- Henry, M., Huang, W., Cristiani, G., Belluau, M. & Durbec, J.P., 1982. Toxicité et bioaccumulation du cadmium chez la palourde *Ruditapes decussatus*, en fonction des facteurs temps, concentration et température. *Vies Journées d'Etudes Pollutions Marines en Méditerranée*, CIESM, Caunes, 737-742.
- Henry, M., Huang, W., Cornet, C., Belluau, M. & Durbec, J.P., 1984. Contamination accidentelle par le cadmium d'un mollusque *Ruditapes decussatus*: bioaccumulation et toxicité (CL50, 96h). *Oceanologica Acta*, **7**: 329-335.
- Hernández-Hernández, F., Medina, J., Ansuategui, J. & Conesa, M., 1990. Heavy metal concentrations in some marine organisms from the Mediterranean sea (Castellon, Spain): metal accumulation in different tissues. *Scientia Marina*, **54**(2): 113-129.
- High, K.A., Barthet, V.J., McLaren, J.W. & Blais, J.S., 1997. Characterisation of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**(6): 1111-1118.
- His, E., Beiras, R. & Seaman, M., 1999a. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Advances in Marine Biology*, **37**: 1-178.
- His, E., Heyvang, L., Geffard, O. & de Montaudoin, X., 1999b. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research*, **33**: 1706-1718.
- Holwerda, D.A., 1991. Cadmium kinetics in freshwater clams. V. Cadmium-copper interactions in metal accumulation by *Anodonta cygnea* and characterization of the metal-binding protein. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**: 432-437.

Houot, O. & Tarallo, P., 1991. Le cuivre. *In*: Chappuis (Ed.). *Les oligoéléments en médecine et biologie*. Lavoisier Tec & Doc, Paris & Editions Médicales Internationales, Cachan, 459-488.

Hugget, R.J., Kimerle, R. A., Mehrle, P.M. & Bergman, H.L., 1992. *Biomarkers-Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, pp. 347. Boca raton: Lewis Publishers.

Imber, B.E., Thompson, J.A.J. & Ward, S., 1987. Metal-binding protein in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: assessment of the protein as a biological environmental indicator. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **38**: 707-714.

Isani, G., Andreani, G., Kindt, M. & Carpené, E., 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cellular and Molecular Biology*, **46**(2): 311-330.

Ivankovic, A., Kavar, T., Caput, P., Mioc, B. & Dove, P., 2002. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. *Animal Genetics*, **33**(3): 169.

J

Jickells, T., 1995. Atmospheric inputs of metals and nutrients to the oceans: their magnitude and effects. *Marine Chemistry*, **48**: 199-214.

Johansson, C., Cain, D. J., and Laoma, S. N., 1986. Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*. *Marine Ecology Progress Series*, **28**: 87-97.

Joux-Arab, L., Berthet, B. & Robert, J.M., 2000. Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pinnate diatom *Haslea ostrearia*? *Marine Biology*, **136**: 323-330.

Jurkiewicz, A., Turnau, K., Mesjasz-Przybytowicz, W. & Godzik, B., 2001. Heavy metal localisation in mycorrhizas of *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (Orchidaceae) from zinc mine tailings. *Protoplasma*, **218**: 117-124.

K

Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. *In*: Riordan J.F. & Vallée B. (Eds.). *Methods in Enzymology*, **205**: 613-626. Academic Press, San Diego.

Kägi, J.H.R., 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. *In*: Suzuki KT, Imura N, Kimura M (Eds.). *Metallothioneins III- Biological roles and medical implications*, pp 29-55. Birkhäuser Verlag, Basel.

Kägi, J.H.R. & Vallée, B.L., 1961. Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *The Journal of Biological Chemistry*, **236**: 2435.

Kägi, J.H.R. & Nordberg, M., 1979. Metallothionein. *Proceedings of the first international meeting on metallothioneins and other Low Molecular Weight Metal Binding Proteins*. Birkhauser Verlag, Basel, 378 p.

- Kägi, J.H.R. & Kojima, Y., 1987. *Metallothionein II*. Birkhauser Verlag, Basel, 755 p.
- Kägi, J.H.R. & Schaffer, A., 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27: 8509-8515.
- Karin, M. & Richard, R.I., 1982. Human metallothionein genes primary structure of metallothionein II gene and a related processed gene. *Nature*, 299: 797-802.
- Khalil, M.A., Abdel-Lateif, H.M., Bayoumi, B.M. & van Straalen, N.M., 1996. Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (*Oligochaeta: Annelida*), using the toxic unit approach. *Applied Soil Ecology*, 4(3): 213-219.
- Kluytmans, J.H., Brands, F. & Zandee, D.I., 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 24: 189-192.
- Kojima, Y., Binz, P.A. & Kägi, J.H.R., 1999. Nomenclature of metallothionein: Proposal for a revision. *Int. Klassen C (Ed.)*. *Metallothionein IV*, pp. 3-6. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kraak, M.H.S., Lavy, D., Peeters, W.H.M. & Davids, C., 1992. Chronic ecotoxicology of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23: 363-369.
- Kraak, M.H.S., Schoon, H., Peeters, W.H.M. & van Straalen, N.M., 1993. Chronic ecotoxicity of mixtures of Cu, Zn, and Cd to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25: 315-327.
- Kraak, M.H.S., Lavy, D., Schoon, D., Toussaint, M., Peeters, W.H.M. & van Straalen, N.M., 1994. Ecotoxicity of mixtures of metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 109-114.

L

- Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. & Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*, 50: 51-71.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.C. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. *In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F (Eds.). Biomarqueurs en Écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, 1-9. Masson, Paris.
- Lange, A., Ausseil, O. & Segner, H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131C: 231-243.
- Langston, W.J. 1990. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. *In: Furness RW, Rainbow PS (Eds.). Heavy metal levels in marine environmental*, pp. 101-122. CRC Press, Boca Raton.
- Langston, W.J. & Zhou, M., 1986. Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. *Marine Biology*, 92: 505-515.

- Langston, W.J. & Zhou, M., 1987. Cadmium accumulation, distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica*: neither metallothionein nor metallothionein-like proteins are involved. *Marine Environmental Research*, **21**: 225-237.
- Langston, W.J. & Spence, S.K., 1995. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. In: Tessier A, Turner DR (Eds.). *Metal speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, pp. 407-478. John Wiley & Sons New-York.
- Langston, W.J., Bebianno, M.J. & Burt, G.R., 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston, W.J. & Bebianno, M.J. (Eds.). *Metal metabolism in aquatic environments*, chap 8, pp. 219-284. Chapman & Hall, London.
- Law, R.J., Waldo, M.J., Allchin, C.R., Laslett, R.E. & Bailey, K.J., 1994. Contaminants in sea-water around England and Wales: results from monitoring surveys, 1990-1992. *Marine Pollution Bulletin*, **28**: 668-675.
- Lecœur, S., Videman, B. & Berny, Ph., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research*, **94**: 184-191.
- Légaré, S., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C. & Rainbow, P.S., 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **246**: 259-279.
- Lerch, K., Ammer, D. & Olafson, R.W., 1982. Crab metallothionein: primary structures of metallothioneins 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**(5): 2420-2426.
- Leung, K.M.Y. & Furness, R.W., 1999. Induction of metallothionein in dogwhelk *Nucella lapillus* during and after exposure to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **43**: 156-164.
- Leung, K.M.Y. & Furness, R.W., 2001. Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere*, **44**: 321-325.
- Liu, J., Kershaw, W.C. & Klaassen, C.D., 1991. The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **107**: 27-34.
- Lobel, P.B. & Wright, D. A., 1983. Frequency distribution of zinc concentration in the common mussel *Mytilus edulis* (L.). *Estuaries*, **6**: 154-159.
- Lobel, P.B., Mogie, P., Wright, D.A. & Wu, B.L., 1982. Metal accumulation in four molluscs. *Marine Pollution Bulletin*, **13**(5): 170-174.
- Iuoma, S.N. & Carter, J.L., 1991. Effects of trace metals on aquatic benthos. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology Concepts & Applications*, pp 261-300. Lewis Publisher, Chelsea.
- Lussier, S.M., Gentile, J.H. & Walker, J., 1985. Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (Crustacea: Mysidacea). *Aquatic Toxicology*, **7**(1-2): 25-35.

M

- Mackay, E.A., Overnell, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P.E., Kägi, H.R. & Fothergill, J.E., 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry*, **218**: 183-194.
- Manley, A.R., 1983. The effects of copper on the behaviour, respiration, filtration and ventilation activity of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **63**: 205-222.
- Maret, W. & Vallée, B.L., 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 3478-3482.
- Margoshes M. & Vallée B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, **79**: 4813-4814.
- Maroni, G., 1990. Animal Metallothioneins. *In*: Jonathan Shaw, A. (Ed.). *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, pp. 215-232. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Marigómez, I., Soto, M., Carajaville, M.P., Angulo, E. & Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, **56**: 358-392.
- Martin, M. & Richardson, B., 1991. Long term contaminant biomonitoring: views from southern and northern hemisphere perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, **22**(11): 533-537.
- Martin M., Osborn K.E., Billig P. & Glickstein N., 1981. Toxicities of ten metals to *C. gigas*, *M. edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, **4**: 185-186.
- Mason, A.Z., 1983. The uptake, accumulation and excretion of metals by the marine prosobranch gastropod mollusc *Littorina littorea* (L.). Ph.D. Thesis, University of Wales, Bangor. Mason, 1983.
- Manson, A.Z. & Nott, J.A., 1980. A rapid, routine technique for the X-ray microanalysis of microincinerated cryosections: A SEM study of inorganic deposits in tissues of the marine gastropod *Littorina littorea* L. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **28**: 1301-1311.
- Mason, A.Z. & Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. *In*: Tessier A, Turner DR (Eds.). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, pp 469-608. Wiley & Sons, New York, USA.
- Mason, A.Z., Simkiss, K & Ryan, K.P., 1984. The ultrastructural localisation of metals in specimens of *Littorina littorea* collected from clean and polluted sites. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **64**: 699-720.
- McLeese, D.W. & Ray, S. 1984. Uptake and excretion of cadmium, CdEDTA, and zinc by *Macoma balthica*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **32**: 85-92.

- Mersch, J., Morhain, E. & Mouvet, C., 1993. Laboratory and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchoslegium riparioides*. *Chemosphere*, 27: 1475-1485.
 - Messerle, B.A., Schäffer, A., Vašák, M., Kägi, J.H.R. and Wäthrich, K., 1992. Comparison of the solution conformations of human [Zn₂]-metallothionein-2 and [Cd₂]-metallothionein-2 using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 225: 433-443.
 - Morisson, G.M.P., 1989. Trace element speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters. In: Batley GE (Ed.). *Trace element speciation: analytical methods and problems*, pp. 25-41. CRC Press. Boca Raton.
 - Morse, J.W., Presley, B.J., Taylor, R.J., Benoit, G. & Santschi, P., 1993. Trace metal chemistry of Galveston Bay: water, sediment and biota. *Marine Environmental Research*, 36: 1-37.
 - Mouneyrac, C., Amiard, J.C. & Amiard-Triquet C., 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 162: 125-135.
 - Mouneyrac, C., Berthet, B. & Amiard, J.C., 1999. Cd distribution in the tissues of oyster (*Crassostrea gigas*) exposed chronically in situ. *Water, Air, and Soil Pollution*. 112: 187-196.
 - Mouneyrac, C., Geffard, A., Amiard, J.C. & Amiard-Triquet, C., 2000. Metallothionein-like proteins in *Macoma balthica*: effects of metal exposure and natural factors. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 34-42.
- N
- Narula, S.S., Brower, M., Hua, Y. & Armitage, I.M., 1995. Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 34(2): 620-31.
 - Neff, J.M., 2002. *Bioaccumulation in marine organisms. Effects of contaminants from oil well produced water*, pp. 452. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
 - Nelson, D.A., Miller, J.E. & Calabrese, A., 1988. Effect of heavy metals on bay scallops, surf clams and blue mussels in acute and long-term exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17: 596-600.
 - Neuhoff, H.G. 1983. Synergistic physiological effects of low copper and various oxygen concentrations on *Macoma balthica*. *Marine Biology*, 77: 39-48.
 - Noël-Lambot, F., 1976. Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of cadmium-binding proteins similar to metallothioneins. *Experientia*, 32: 324-325.
 - Nordberg, N., 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46: 243-254.

Nordberg M. & Kojima Y. 1979. Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. In J. H. R. Kägi and M. Nordberg, (Eds.). *Metallothionein*, pp. 41-116. Birkhäuser Verlag, Basel.

Nott, J. A. & Nicolaidou, A., 1989. Metals in gastropods - metabolism and bioreduction. *Marine Environmental Research*, **28**: 201-205.

Nott, J. A. & Nicolaidou, A., 1993. Bioreduction of zinc and manganese along a molluscan food chain. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **104**: 235-238.

Nott, J. A. & Nicolaidou, A., 1994. Variable transfer of detoxified metals from snails to hermit crabs in marine food chains. *Marine Biology*, **120**: 369-377.

O

O'Halloran, T.V. & Culotta, V.C., 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**: 25025-25060.

Ohtake, H., Suyemitsu, T. & Koga, M., 1983. Sea urchin (*Anthodidaris crassispina*) egg zinc-binding protein. Cellular localization, purification and characterization. *Biochemical Journal*, **211**: 109-118.

Okazaki, R.K. & Panietz, M.I., 1981. Depuration of twelve trace metals in tissues of oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, **63**: 113-120.

Olabarrieta, I. L'Azou B., Yuric S., Cambar, J. & Cajaraville, M.P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, **15**: 511-517.

Olsson, P.E., Haux, C. & Forlin, L., 1987. Variation in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **3**: 39-47.

Otvos, J.D., Olafson, R.W. & Armitage, I.M., 1982. Structure of an invertebrate metallothionein from *Scylla serrata*. *The Journal of Biological Chemistry*, **357**(5): 2427-2431.

Otvos, J.D., Liu, X., Li, H., Sheng, G. & Basti, M., 1993. Dynamic aspects of metallothionein structure. In Suzuki K.T., Imura N., Kimura M (Eds.). *Metallothionein III: Biological roles and medical implications*, pp. 215-221. Birkhäuser Verlag Basel.

P

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. & Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei: Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, **50**: 109-124.

Park, J.D., Liu, Y. & Klaassen, C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and others metals. *Toxicology*, **163**: 93-100.

Pavieic, J., Skreblin, M. & Raspor, B., 1987. Metal pollution assessment of the marine environmental by determination of metal-binding proteins in *Mytilus* sp. *Marine Chemistry*, **22**: 235-248.

- Pavicic, J., Raspor, B. & Martinic, D., 1993. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. *Marine Biology*, **115**: 435-444.
- Pavicic, J., Skreblin, M., Kregar, I., Tusek-Znidaric, M. & Stegnar, P., 1994a. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis* exposed to the elevated sea water metal concentrations. I. Toxic effect of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comparative Biochemistry Physiology*, **107**: 249-257.
- Pavicic, J., Smodis, B., Skreblin, M., Kregar, I. & Stegnar, P., 1994b. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis* exposed seawater metal concentrations. II. Stage-specific fluctuations in sensitivity toward Zn and Cd and their bioaccumulation into veliger larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **109**: 37-46.
- Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Hojrup, P., Andersen, J.S., Roepstorff, P., Knudsen, J. & Depledge, M.H., 1994. Purification and characterization of cadmium-induced metallothionein from the shore crab *Carcinus maenas* (L). *The Biochemical Journal*, **297**: 609-614.
- Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Methé, G., Couillard, Y., Giguère, A., Campbell, P.G. & Hale, L., 2002. Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalve (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability. *Environmental Pollution*, **118**: 5-17.
- Phelps, H.L., Wright, D.A. & Mihursky, J.A., 1985. Factors affecting trace metal accumulation by estuarine oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, **22**: 187-197.
- Phillips, D.J.H., 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Marine Biology*, **38**: 56-59.
- Phillips D.J.H., 1977a. Effects of salinity on the net uptake of zinc by the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **41**: 79-88.
- Phillips, D.J.H., 1977b. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of trace metals in Scandinavian waters. I. Zinc and Cadmium. *Marine Biology*, **43**: 283-291.
- Phillips, D.J.H., 1977c. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review. *Environmental Pollution*, **13**: 281-317.
- Phillips, D.J.H., 1985. Organochlorines and trace metals in green-lipped mussels *Perna viridis* from Hong Kong waters: a test of indicator ability. *Marine Ecology Progress Series*, **21**: 251-258.
- Phillips, D.J.H., 1993. Bioaccumulation. In: *Handbook of Ecotoxicology*. P. Calow (Ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 378-396.
- Phillips, D.J.H., & Segar, D.A., 1986. Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Marine Pollution Bulletin*, **17**: 10-17.

Phillips, D.J.H. & Rainbow, P.S., 1988. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements: a comparative study. *Marine Ecology Progress Series*, **49**: 83-93.

Phillips, D. & Rainbow, P., 1993. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. Elsevier Applied Science, UK, p. 371.

Pohl, C., Kattner, G. & Schulz-Baldes, M., 1993. Cadmium, copper, lead and zinc on transects through Arctic and Eastern Atlantic surface and deep waters. *Journal of Marine Systems*, **4**: 17-29.

Ponzano, E., Dondero, F., Bouquegneau, J.M., Sack, R., Hunziker, P. & Viarengo, A., 2001. Purification and biochemical characterization of a cadmium metallothionein from the digestive gland of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith 1902). *Polar Biology*, **24**: 147-153.

Posthuma, L., Baerselman, R., Van Veen, R.P.M. & Van Bremen, E.M.D., 1997. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**(2): 103-121.

Postma, J.F., Van Kleunen, A. & Admiraal, W., 1995. Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (Diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **29**: 469-475.

Prasad, A.S., 1993. Essentiality and toxicity of zinc. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, **19**(1): 134-136.

Q

Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C., Froelick G.J., Kelly E.J., Zambrovic B.P. & Palmiter R.D., 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, **33**: 7250-7259.

R

Rainbow, P.S., 1990. *In*: Furness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.). *Heavy Metals in the Marine Environment*, pp 67-80. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **31**(4-12): 183-192.

Rainbow, P.S., 1997. Trace metal accumulation in marine invertebrates. Marine biology or marine chemistry? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **77**: 195-210

Rainbow, P.S. & Dallinger, R., 1993. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. *In*: R. Dallinger and P.S. Rainbow. (Eds.). *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, pp. 119-131. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Rainglet, F., 1998. Biomarqueurs spécifiques de pollution: Evaluation de l'exposition et des effets précoces des déchets solides (ordures ménagères, mâchefers) à l'égard du mollusque bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). Thèse de Doctorat, Université de Nantes. 221p.

- Rand, G. M., 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. Rand, G. M. (Ed.). pp. 1125. 2nd Edition. Taylor & Francis, Bristol, Pennsylvania.
- Raspor, B. & Pavicic, J., 1991. Induction of metallothionein-like proteins in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to mixture of trace heavy metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, **3**(2): 39-46.
- Raspor, B., Pavicic, J., Kozar, S., Kwokal, Z., Paic, M., Odzak, N., Ulevic, I. & Kljakovic, Z., 1999. Assessment of metal exposure of marine edible mussels by means of a biomarker. *In*: Klassen C (Ed.). *Metallothionein IV*, pp. 629-632. Birkhäuser Verlag Basel.
- Rausser, W.E., 1993. γ -glutamylcysteinyl isopeptides: structure, synthesis and metal-binding complexes. *In*: Suzuki K. T., Imura N. & Kimura M. (Eds.). *Metallothionein III*, pp. 479. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Redpath, K.J. & Davenport, J., 1988. The effect of copper, zinc and cadmium on the pumping rate of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology*, **13**: 217-224.
- Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **34**: 48-63.
- Regoli, F., & Orlando, E., 1994. Seasonal variation of trace metal concentrations (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* comparison between a polluted and non polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **27**:36-43.
- Richards, R.L., Heguy, A. & Karin, M. 1984. Structural and functional analysis of the human metallothionein-1A gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell*, **37**(1): 263-72.
- Riek, R., Precheur, B., Wang, Y., Mackay, E. A., Wider, G., Guntert, P., Liu, A., Kägi, J.H.R. & Wuthrich, K., 1999. NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *Journal of Molecular Biology*, **291**: 417-428.
- Ringwood, A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **22**: 288-295.
- Ringwood, A.H., 1993. Age-specific differences in cadmium sensitivity and bioaccumulation in bivalve molluscs. *Marine Environmental Research*, **35**: 35-39.
- Ringwood, A.H. & Brouwer, M., 1993. Expression of constitutive and metal-inducible metallothioneins in oyster embryos (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **106B**(3): 523-529.
- Ringwood, A.H., Connors, D.E. & DiNovo, A., 1998. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Marine Environmental Research*, **46**(1-5): 591-595.

- Robert, R. & His, E., 1985. Combined effects of salinity and cadmium chloride upon embryos and larvae of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, **15**: 303-312.
- Roch M. & McCarter J.A. 1984. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - I. Exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **77**: 71-75.
- Roesijadi, G., 1980. Influence of copper on the clam *Protothaca staminea*: effects on gills and occurrence of copper-binding proteins. *Biological Bulletin*, **158**(2): 233-247.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **22**: 81-114.
- Roesijadi, G., 1994a. Behaviour of metallothionein-bound metals in a natural population of estuarine mollusc. *Marine Environmental Research*, **38**: 147-168.
- Roesijadi, G., 1994b. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives*, **102**(12): 91-96.
- Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**: 117-123.
- Roesijadi, G., 2000. Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification. *Cellular and Molecular Biology*, **46**(2): 393-405.
- Roesijadi, G. & Klerks, P.L., 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *The Journal of Experimental Zoology*, **251**: 1-12.
- Roesijadi, G. & Unger, M., 1993. Cadmium uptake in gills of the molluscs *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquatic toxicology*, **24**: 195-206.
- Roesijadi, G., Unger, M.E. & Morris, J.E., 1988. Immunochemical quantification of metallothioneins of a marine mollusc. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **45**: 1257-1263.
- Roesijadi, G., Kielland, S & Klerks, P.L., 1989. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **273**(2): 403-413.
- Roméu, M. & Gnassia-Barelli, M., 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper and zinc. *Comparative Biochemical Physiology*, **111C**(3): 457-463.
- Romero-Isart, N. & Vařák, M., 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **88**: 388-396.
- Ryu, S.K., Park, J.S. & Lee, I.S., 2003. Purification and characterization of copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **134C**: 101-107.

S

- Sasikumar, N., Clare, A.S., Gerhart, D.J., Stover, D. & Rittshof, 1995. Comparative toxicities of selected compounds to nauplii of *Balanus amphitrite* Darwin and *Artemia* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**: 289-296.
- Scholz, N., 1980. Accumulation, loss and molecular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, **33**: 68-78.
- Scott, D.M. & Major, C.W., 1972. The effect of copper(II) on survival, respiration and heart rate in the common mussel, *Mytilus edulis*. *The Biological Bulletin*, **143**: 131-136.
- Serafim, A., 1993. Acumulação, distribuição e eliminação de alguns metais pela amêijoia *Ruditapes decussatus* (Linné, 1785). Relatório de Estágio da Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, 42p.
- Serafim, M.A. & Bebianno, M.J., 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus* sex and seasonal effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(3): 544-552.
- Serafim, M.A., Company, R.M., Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Marine Environmental Research*, **54**: 361-365.
- Serra, R., Carpenè, E., Marcantonio, A.C. & Isani, G., 1995. Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in the bivalve *Scapharca inaequivalvis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **111C**: 164-174.
- Serra, R., Isani, G., Tramontano, G. & Carpenè, E., 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **123C**: 165-174.
- Simes, D.C., Bebianno, M.J. & Moura, J.J., 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology*, **63**(3): 307-18.
- Simkiss, K., 1984. Des invertébrés neutralisent les métaux toxiques. *La recherche*, **154**: 538-540.
- Simkiss, K. & Taylor M.G., 1989. Convergence of cellular systems of metal detoxication. *Marine Environmental Research*, **28**: 211-214.
- Slater, J.P., Mildwan, A.S. & Loch L.A., 1971. Zinc in DNA polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **44**: 37.
- Sobral, P. & Widdows, J., 1997. Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from Southern Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, **34**(12): 992-1000.
- Soto, M., Quincoces, I., Lekube, X. & Marigómez, I., 1998. Autometallographed metal content in digestive cells of winkles: a cost-effective screening toll for monitoring Cu and Zn pollution. *Aquatic Toxicology*, **40**: 123-140.
- Stauber, J.L. & Florence, T.M., 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom, *Nitzschia closterium*. *Marine Biology*, **105**: 519-524.

Stebbing, A.R.D., 1976. The effects of low metal levels on a clonal hydroids. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **56**: 977-994.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. & Van Veld, P.A. Jr., 1992. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect, *In*: Hugget, R.J., Kimerle, R. A., Merlhe, P.M. Jr., & Bergman, H.L. (Eds.). *Biomarkers-Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, pp 235-335. Lewis, Chelsea.

Stillman, M.J., 1995. Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews*, **144**: 461-511.

Stillman, M.J., Shaw, F.C. III & Suzuki, K.T., 1992. *In*: Stillman, M.J., Shaw, F.C. III & Suzuki, K.T.(Eds.). *Metallothioneins Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytocbelatins and Metalthiolate Complexes*. VCH Publishers, New York. p.1.

Strömberg, T. & Nielsen, M.V., 1991. Spawning frequency, growth and mortality of *Mytilus edulis* larvae, exposed to copper and diesel oil. *Aquatic Toxicology*, **21**: 171-180.

Sunila, I. & Lindström, R. 1985. The structure of the interfilamentar junction of the mussel (*Mytilus edulis* L.) gill and its coupling by copper and cadmium exposures. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **81C**: 267-272.

Suzuki, K.T., Someya, A., Komada, Y. & Ogra, Y., 2002. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **88**: 173-182.

Sze, P.W.C. & Lee, S.Y., 2000. Effects of chronic copper exposure on the green mussel *Perna viridis*. *Marine Biology*, **137**: 379-392.

T

Taylor, D., 1978. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 5. Copper. Imperial Chemical Industries. Rapport BL/A/1900, 21p.

Taylor, D., 1981a. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 13. Zinc. Imperial Chemical Industries. Rapport BL/A/2143, 25p.

Taylor, D., 1981b. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 2. Cadmium. Imperial Chemical Industries. Rapport BL/A/2073, 2nd ed, 46p.

Taylor, M.G. & Simkiss, K., 1984. Inorganic deposits in invertebrate tissues. *Environmental Chemistry*, **3**: 102-138.

Thomson, J.D., Pirie, B.J.S. & George, S.G., 1985. Cellular metal distribution in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thum) determined by quantitative X-ray microprobe analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **85**: 37-45.

Tóth, L., Juhász, M., Varga, T., Csikkel-Szolnoki, A. & Nemcsók, J., 1996. Some effect of CuSO₄ on carp. *Journal of Environmental Science and Health B*, **31**(3): 627-635.

Tricot, A., 1989. Cadmium. In Baumberger (Ed.). *Encyclopaedia Universalis*, Corpus 4, Paris, pp 725-732.

U

Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. & Tomonaga, M., 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7: 337-347.

Udom, A. O. & Brady, F. O., 1980. Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. *The Biochemical Journal*, 187(2): 329-35.

UNEP/RAMOGÉ, 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme (Athenes: UNEP). 92p.

Unger, M.E., Chen, T.T., Murphy, C.M., Vestling, M.M., Fenselau, C. & Roesijadi G., 1991. Primary structure of molluscan metallothioneins deduced from PCR-amplified cDNA and mass spectrometry of purified proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1074: 371-377.

V

Vaher, M., Romero-Isart, N., Vašák, M. & Palumaa, P., 2001. Reactivity of Cd₂-metallothionein with Cu(II) ions: evidence for a cooperative formation of Cd₂, Cu(II)₂-metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83: 1-6.

Valdovinos, C., Figueroa, R., Cid, H., Parra, O., Araya, E., Privitera, S. & Olmos, V., 1998. Transplant of benthic organisms between lentic systems: Reflects the trace metals bioavailability in the environment? *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 43(4): 467-475.

Vallée, B.L. & Auld, D.S., 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29: 5647-9.

Vallée, B.L. & Falehuk, K.H., 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73: 79-118.

Vanegas, C., Espina, S., Botello, A.B., & Villanueva, S., 1997. Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in the white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 87-92.

Vašák, M., 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 205: 452-458.

Vašák, M., Overnell, J. & Good, M., 1987. Spectroscopic and chemical approaches to the study of metal-thiolate clusters in metallothionein (MT). In: Kagi, J.H.R. & Kojima, Y. (Eds.). *Metallothionein II*, pp. 755. Birkhauser Verlag, Basel.

Vega, M.M., Marigómez, J.A. & Angulo, E., 1989. Quantitative alterations in digestive cell structure of the marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium. *Marine Biology*, 103: 547-553.

- Vereauteren, K. & Blust, R., 1999. Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers. *Marine Biology*, **135**: 615-626.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **16**: 153-158.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Review. Aquatic Science* **1**: 295-316.
- Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca^{2+} homeostasis and possible alteration of signal transduction pathway. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, **20** (3), pp. 85-110. Springer-verlag Berlin Heidelberg.
- Viarengo, A. & Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **104C**(3): 355-372.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Capelli, R. & Orunesu, M., 1980. Effect of copper on the uptake of aminoacids, on protein synthesis and on ATP content in different tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Marine Environmental Research*, **4**: 145-152.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., Zanicchi, G. & Orunesu M., 1981a. Synthesis of Cu-binding proteins in different tissues of mussels exposed to the metal. *Marine Pollution Bulletin*, **12**(10): 347-350.
- Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N. & Orunesu M., 1981b. Accumulation and detoxification of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam.: a study of subcellular distribution in the digestive gland cells. *Aquatic Toxicology*, **1**: 147-157.
- Viarengo, A., Palermo, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R. & Orunesu M., 1985. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gills and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Marine Environmental Research*, **16**: 23-36
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Mazzucotelli, A., Orunesu, M. & Bouqueneau, J. M. 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **93C**: 389-395.
- Viarengo, A., Mancinelli, G., Pertica, M., Fabbri, R. & Orunesu, M., 1993. Effects of heavy metals on the Ca^{2+} ATPases activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam). *Comparative Biochemical Physiology*, **106C**(3): 655-660.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. & Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, **44**: 69-84.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E. & Blasco, J., 1999a. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **46**: R1612-R1619.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. & Fabbri, R., 1999b. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, **4**(6): 455-466.

Vicente, N., Baghdiguian, S., Henry, M. & Riva, A., 1988. Phénomènes synergetiques induits par l'action combinée d'un jeun prolongé à basses et hautes températures et d'une contamination par un sel de cadmium chez *Ruditapes decussatus*. *Oceanis*, **14**(1): 125-131.

Vilela, H., 1950. Vida bentônica de *Tapes decussatus* (L.). *Separatas do Arquivo do Museu Bocage*, **7**, **1**: 209-213.

Voet, D., Voet, J.G. & Pratt, C.W., 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. Voet, D., Voet, J.G. & Pratt, C.W. (Eds.), p 295. John Wiley & Sons, New York.

W

Wallner-Kersanach, M., Theede, H., Eversberg, U., Lobo, S., 2000. Accumulation and elimination of trace metals in a transplantation experiment with *Crassostrea rhizophorae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **38**: 40-45.

Wang, W.X., 2002. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. *Aquatic Toxicology*, **56**: 153-165.

Wang, W.X. & Dei, R.C.H., 1999. Factors affecting trace element uptake in the black mussel *Septifer virgatus*. *Marine Ecology Progress Series*, **186**: 161-172.

Wang, W.X. & Fisher N.S., 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental toxicology and chemistry*, **18**: 2034-2045.

Wang, D., Couillard, Y., Campbell, P.G.C. & Jolicœur, P., 1999. Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, **56**: 774-784.

Watkins, B. & Simkiss, K., 1988. The effect of oscillating temperatures on the metal ion metabolism of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **68**: 93-100.

Webb, M., 1979. *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*, pp. 195-266 Elsevier, North Holland, Amsterdam.

Weltje, L., 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (*Oligochaeta*) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere*, **36**: 2643-2660.

Widdows, J. & Donkin, P., 1992. Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In: *The mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences*, **25**: 205-245.

Winge, D.R., 1991. Copper coordination in metallothionein. *Methods in Enzymology*, **205**: 458-469.

Winge, D.R. & Miklossy, K.A., 1982. Differences in the polymorphic forms of metallothionein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **214**: 80-88.

Wittmann, G., 1979. Toxic metals. *In*: Förstner U. & Wittmann G. (Eds.). *Metal Pollution in the Aquatic Environment*, Chapter B, pp 3-68. Springer-Verlag, Berlin.

Wittmann, G., 1981. Toxic metals, 3-70. *In*: U. Förstner and G.T.W. Witmann (Eds.). *Metal pollution in the Aquatic Environmental*, pp. 3-70. Springer-Verlag, Berlin.

Wu, R.S.S., Lam, P.K.S. & Zhou, B., 1997. A settlement inhibition assay with cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Chemosphere*, **35**(9): 1867-1874.

Y

Yang, M.S., Lai, K.P., Cheng, K.Y. & Wong, C.K.C., 2000. Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of CdCl₂. *Toxicology*, **154**: 103-111.

Z

Zamuda, C.D., Sunda, W.G., 1982. Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation. *Marine Biology*, **66**: 77-82.

Zelikoff, J.T. and M.D. Cohen. 1996. Immunotoxicology of Inorganic Metal Compounds. Experimental Immunotoxicology. CRC Press, Boca Raton, FL pp 354.

Tabela A.1 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cd (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas durante 90 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cd (nmol g ⁻¹)			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	5,57 ± 1,41	1,39 ± 0,37	1,51 ± 0,42	2,25 ± 0,62
	7	5,52 ± 0,55	0,98 ± 0,10	2,22 ± 0,22	1,87 ± 0,23
	14	4,63 ± 0,46	1,33 ± 0,13	1,07 ± 0,11	1,78 ± 0,22
	21	6,76 ± 0,68	1,07 ± 0,11	1,07 ± 0,11	1,51 ± 0,46
	30	7,12 ± 0,71	2,05 ± 0,20	2,14 ± 0,21	2,40 ± 0,29
	40	5,87 ± 0,59	1,51 ± 0,15	1,69 ± 0,17	2,40 ± 0,27
	50	8,10 ± 0,81	1,87 ± 0,19	1,69 ± 0,17	3,38 ± 0,45
	60	4,63 ± 0,46	1,60 ± 0,16	1,51 ± 0,15	2,58 ± 0,15
	75	5,25 ± 0,52	1,33 ± 0,13	1,25 ± 0,12	2,22 ± 0,27
	90	4,27 ± 0,43	0,98 ± 0,09	1,16 ± 0,12	2,94 ± 0,22
Glândula Digestiva	0	30,10 ± 7,89	4,48 ± 0,95	9,58 ± 1,52	15,70 ± 5,19
	7	34,34 ± 3,43	5,16 ± 0,52	10,68 ± 1,07	8,72 ± 1,85
	14	47,33 ± 4,73	4,54 ± 0,45	8,10 ± 8,10	16,64 ± 3,83
	21	32,38 ± 3,24	3,47 ± 0,35	7,29 ± 7,29	13,70 ± 4,45
	30	31,22 ± 3,12	4,18 ± 0,42	9,43 ± 0,94	15,30 ± 1,76
	40	27,49 ± 2,75	3,38 ± 0,34	8,27 ± 8,27	20,19 ± 5,87
	50	24,29 ± 2,43	3,65 ± 0,36	8,18 ± 8,18	12,54 ± 6,14
	60	23,57 ± 2,36	5,25 ± 0,52	11,12 ± 1,11	21,17 ± 0,72
	75	26,07 ± 2,61	5,78 ± 0,58	10,23 ± 1,02	20,64 ± 1,01
	90	34,96 ± 3,50	5,78 ± 0,58	11,56 ± 1,16	20,91 ± 1,76
Restante parte edível	0	2,58 ± 0,72	0,95 ± 0,20	1,38 ± 0,31	1,19 ± 0,45
	7	2,49 ± 0,25	0,80 ± 0,08	1,16 ± 0,12	1,16 ± 0,05
	14	3,47 ± 0,35	0,98 ± 0,10	1,25 ± 0,12	0,89 ± 0,12
	21	1,96 ± 0,20	0,71 ± 0,07	1,16 ± 0,12	0,80 ± 0,01
	30	1,42 ± 0,14	0,98 ± 0,10	0,89 ± 0,09	0,53 ± 0,09
	40	2,85 ± 0,28	1,07 ± 0,11	1,60 ± 0,16	1,42 ± 0,02
	50	3,91 ± 0,39	1,16 ± 0,12	1,87 ± 0,19	2,05 ± 0,09
	60	2,49 ± 0,25	0,71 ± 0,07	1,25 ± 0,12	1,33 ± 0,05
	75	2,58 ± 0,26	0,89 ± 0,09	1,60 ± 0,16	1,42 ± 0,01
	90	2,58 ± 0,26	0,89 ± 0,09	1,78 ± 0,18	1,51 ± 0,01

Tabela A.2 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cd (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 4 µg Cd l⁻¹ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.
(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cd (nmol g ⁻¹)			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	5,57 ± 1,41	1,39 ± 0,37	1,51 ± 0,42	2,25 ± 0,62
	7	59,78 ± 5,98	10,94 ± 0,11	5,52 ± 0,06	47,33 ± 5,81
	14	88,96 ± 8,90	18,24 ± 0,18	16,99 ± 1,70	65,47 ± 7,01
	21	123,39 ± 12,34	31,94 ± 0,32	26,87 ± 2,69	70,19 ± 9,33
	30	139,93 ± 13,99	31,67 ± 0,32	25,00 ± 2,50	74,37 ± 11,18
	40	164,75 ± 17,90	25,80 ± 0,26	22,77 ± 2,28	98,28 ± 15,36
	50	122,05 ± 12,21	20,46 ± 0,20	20,91 ± 2,09	107,29 ± 9,91
	60	137,53 ± 13,75	19,30 ± 0,19	20,55 ± 2,05	96,17 ± 11,51
	75	123,30 ± 14,90	30,96 ± 0,31	24,46 ± 2,45	97,23 ± 13,20
	90	72,86 ± 7,29	17,35 ± 0,17	20,73 ± 2,07	64,67 ± 5,04
Glândula Digestiva	0	30,10 ± 7,89	4,48 ± 0,95	9,58 ± 1,52	15,70 ± 5,19
	7	84,07 ± 8,41	6,94 ± 0,69	10,59 ± 1,06	54,18 ± 6,65
	14	101,59 ± 10,16	13,52 ± 1,35	16,72 ± 1,67	81,75 ± 7,13
	21	98,75 ± 9,87	18,50 ± 1,85	29,62 ± 2,96	76,86 ± 5,06
	30	168,49 ± 16,85	41,46 ± 4,15	36,83 ± 3,68	115,38 ± 9,02
	40	339,65 ± 33,96	65,65 ± 6,57	78,02 ± 7,80	183,79 ± 19,60
	50	419,09 ± 41,91	67,08 ± 6,71	67,61 ± 6,76	250,87 ± 28,44
	60	277,56 ± 22,76	37,72 ± 3,77	43,59 ± 4,36	152,12 ± 14,63
	75	295,44 ± 17,80	35,85 ± 4,18	122,50 ± 12,25	137,09 ± 10,80
	90	256,65 ± 25,66	79,09 ± 7,91	97,32 ± 9,73	202,74 ± 8,02
Restante parte edível	0	2,58 ± 0,72	0,95 ± 0,20	1,38 ± 0,31	1,19 ± 0,45
	7	8,27 ± 0,83	2,31 ± 0,23	2,94 ± 0,29	3,11 ± 0,30
	14	13,26 ± 1,33	2,67 ± 0,27	6,94 ± 0,69	9,70 ± 0,36
	21	17,70 ± 1,77	7,92 ± 0,79	11,21 ± 1,12	12,37 ± 0,18
	30	21,44 ± 2,14	12,45 ± 1,25	12,54 ± 1,25	17,61 ± 0,36
	40	31,49 ± 3,15	11,30 ± 1,13	14,14 ± 1,41	18,59 ± 0,60
	50	23,31 ± 2,33	10,85 ± 1,09	13,52 ± 1,35	20,99 ± 0,09
	60	28,29 ± 2,83	10,94 ± 1,09	14,14 ± 1,41	21,17 ± 0,32
	75	10,59 ± 1,06	4,27 ± 0,43	6,23 ± 0,62	9,34 ± 0,01
	90	8,72 ± 0,87	6,76 ± 0,68	6,94 ± 1,60	5,43 ± 1,42

Tabela A.3 – Concentração ($\mu\text{mol g}^{-1}$) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a $40 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI – fração subcelular insolúvel; FEPM – fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM – fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cd ($\mu\text{mol g}^{-1}$)			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	5,57 \pm 1,41	1,39 \pm 0,37	1,51 \pm 0,42	2,25 \pm 0,62
	7	93,50 \pm 10,30	59,69 \pm 0,80	21,35 \pm 3,56	102,84 \pm 32,00
	14	292,81 \pm 23,30	83,53 \pm 8,40	79,53 \pm 7,95	146,25 \pm 64,90
	21	431,55 \pm 33,20	106,22 \pm 10,50	70,81 \pm 7,08	204,07 \pm 48,20
	30	658,41 \pm 45,80	127,39 \pm 15,70	102,13 \pm 10,21	336,36 \pm 74,20
	40	687,04 \pm 68,00	183,26 \pm 15,40	81,13 \pm 8,11	405,39 \pm 31,30
	50	674,67 \pm 67,47	123,03 \pm 13,40	93,05 \pm 12,99	512,41 \pm 53,25
	60	539,72 \pm 54,00	107,64 \pm 10,60	94,30 \pm 14,23	437,77 \pm 38,69
	75	547,10 \pm 54,71	126,77 \pm 13,70	111,56 \pm 11,16	327,37 \pm 42,29
	90	130,86 \pm 15,20	28,91 \pm 3,60	19,04 \pm 1,90	64,14 \pm 10,70
Glândula Digestiva	0	30,10 \pm 7,89	4,48 \pm 0,95	9,58 \pm 1,52	15,70 \pm 5,19
	7	224,62 \pm 11,08	56,40 \pm 5,64	76,77 \pm 7,68	186,20 \pm 2,22
	14	306,73 \pm 22,46	72,68 \pm 7,27	67,79 \pm 6,78	224,10 \pm 8,42
	21	570,77 \pm 30,67	99,99 \pm 10,00	79,89 \pm 7,99	365,91 \pm 12,69
	30	1652,52 \pm 57,08	179,97 \pm 18,00	89,76 \pm 8,98	601,13 \pm 30,10
	40	1810,88 \pm 165,25	694,96 \pm 69,50	232,36 \pm 23,24	1200,11 \pm 72,52
	50	1646,03 \pm 162,84	560,89 \pm 56,09	214,57 \pm 21,46	1121,92 \pm 85,29
	60	1628,41 \pm 164,60	541,41 \pm 89,73	185,13 \pm 18,51	834,29 \pm 56,37
	75	978,56 \pm 181,09	564,26 \pm 71,43	208,25 \pm 25,83	750,73 \pm 83,84
	90	978,56 \pm 97,86	211,99 \pm 21,20	110,49 \pm 11,05	587,25 \pm 65,61
Restante parte edível	0	2,58 \pm 0,72	0,95 \pm 0,20	1,38 \pm 0,31	1,19 \pm 0,45
	7	33,89 \pm 3,39	35,67 \pm 3,57	31,49 \pm 3,15	29,36 \pm 3,29
	14	52,40 \pm 5,24	20,82 \pm 2,08	38,96 \pm 3,90	35,41 \pm 0,71
	21	100,35 \pm 10,03	57,65 \pm 5,76	64,50 \pm 6,45	82,91 \pm 2,22
	30	156,04 \pm 15,60	72,59 \pm 7,26	67,88 \pm 6,79	97,95 \pm 1,56
	40	216,17 \pm 21,62	88,34 \pm 8,83	61,12 \pm 6,11	105,24 \pm 6,67
	50	203,27 \pm 20,33	89,32 \pm 8,93	69,12 \pm 6,91	143,49 \pm 4,48
	60	233,08 \pm 23,31	87,71 \pm 8,77	79,35 \pm 7,94	164,67 \pm 6,60
	75	249,80 \pm 24,98	74,83 \pm 9,48	84,69 \pm 8,47	145,45 \pm 7,03
	90	233,52 \pm 23,35	65,03 \pm 6,50	50,80 \pm 5,08	82,73 \pm 11,77

Tabela A.4 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas durante 90 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cu (nmol g ⁻¹)			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	77,51 ± 7,75	17,11 ± 1,71	20,14 ± 2,01	40,25 ± 4,03
	7	69,78 ± 6,98	5,04 ± 0,50	6,58 ± 0,66	58,16 ± 5,82
	14	146,96 ± 14,70	24,43 ± 2,44	36,19 ± 3,87	86,34 ± 8,38
	21	66,87 ± 6,69	5,05 ± 0,50	17,26 ± 1,73	44,57 ± 4,46
	30	58,83 ± 5,88	5,78 ± 0,58	19,72 ± 1,97	33,33 ± 3,33
	40	75,98 ± 7,60	5,31 ± 0,53	18,38 ± 1,84	52,29 ± 5,23
	50	87,62 ± 8,76	5,36 ± 0,54	18,25 ± 1,83	64,00 ± 6,40
	60	104,08 ± 10,41	18,87 ± 1,69	31,59 ± 3,16	55,62 ± 5,56
	75	48,80 ± 4,88	5,92 ± 0,59	7,56 ± 0,76	35,32 ± 3,53
	90	53,20 ± 5,32	8,26 ± 0,83	10,26 ± 1,03	34,68 ± 3,47
Glândula Digestiva	0	263,40 ± 26,34	20,80 ± 2,08	84,54 ± 8,45	158,06 ± 15,81
	7	259,36 ± 25,94	36,95 ± 3,70	107,02 ± 10,70	115,38 ± 11,54
	14	282,79 ± 28,28	32,69 ± 3,27	109,51 ± 10,95	140,59 ± 14,06
	21	229,70 ± 22,97	35,05 ± 3,50	116,54 ± 11,65	78,11 ± 7,81
	30	111,48 ± 11,15	6,33 ± 0,63	54,36 ± 5,44	50,79 ± 5,08
	40	123,29 ± 12,33	6,36 ± 0,64	74,13 ± 7,41	42,80 ± 4,28
	50	202,58 ± 20,26	6,34 ± 0,63	73,78 ± 7,38	122,47 ± 12,25
	60	182,74 ± 18,27	6,46 ± 0,65	34,49 ± 3,45	141,79 ± 14,18
	75	82,77 ± 8,28	7,17 ± 0,72	60,43 ± 6,04	15,16 ± 1,52
	90	42,93 ± 4,29	13,06 ± 1,31	70,38 ± 7,04	40,50 ± 4,00
Restante parte edível	0	69,23 ± 18,88	24,52 ± 2,45	37,35 ± 6,92	7,36 ± 9,51
	7	75,65 ± 15,74	33,04 ± 3,30	23,67 ± 7,56	18,94 ± 4,87
	14	50,39 ± 18,88	44,55 ± 4,45	30,68 ± 5,04	24,84 ± 9,39
	21	65,79 ± 11,02	38,44 ± 3,84	30,63 ± 6,58	3,27 ± 0,59
	30	41,15 ± 18,88	36,38 ± 3,64	25,29 ± 4,11	20,53 ± 11,13
	40	69,39 ± 18,88	40,15 ± 4,01	28,11 ± 6,94	1,13 ± 7,93
	50	89,51 ± 3,15	44,82 ± 9,20	31,38 ± 4,23	13,31 ± 10,29
	60	39,24 ± 18,88	35,12 ± 3,51	27,19 ± 3,92	23,07 ± 11,45
	75	52,42 ± 4,72	36,86 ± 3,69	28,93 ± 5,24	13,37 ± 4,21
	90	74,64 ± 18,88	40,21 ± 4,02	31,39 ± 7,46	13,05 ± 3,40

Tabela A.5 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a $25 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI – fração subcelular insolúvel; FEPM – fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM – fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cu (nmol g^{-1})			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	77,51 \pm 7,75	17,11 \pm 1,71	20,14 \pm 2,01	40,25 \pm 4,03
	7	85,61 \pm 8,56	40,44 \pm 4,04	9,44 \pm 0,94	35,72 \pm 3,57
	14	289,18 \pm 28,92	71,45 \pm 7,14	67,71 \pm 6,77	150,02 \pm 15,00
	21	321,00 \pm 12,13	70,03 \pm 7,00	18,10 \pm 1,81	233,00 \pm 3,32
	30	493,24 \pm 49,32	65,02 \pm 6,50	82,01 \pm 8,20	346,21 \pm 34,62
	40	539,76 \pm 53,98	170,85 \pm 17,08	149,79 \pm 14,98	352,00 \pm 21,91
	50	148,07 \pm 14,81	54,92 \pm 5,49	40,68 \pm 4,07	52,46 \pm 5,25
	60	57,27 \pm 5,73	23,07 \pm 2,31	26,25 \pm 2,63	7,94 \pm 0,79
	75	44,83 \pm 4,48	21,79 \pm 2,18	24,94 \pm 2,49	1,90 \pm 0,00
	90	53,20 \pm 9,00	8,26 \pm 2,00	10,26 \pm 1,90	34,68 \pm 6,60
Glândula Digestiva	0	263,40 \pm 26,34	20,80 \pm 2,08	84,54 \pm 8,45	158,06 \pm 15,81
	7	94,73 \pm 9,47	33,05 \pm 3,30	14,95 \pm 1,49	46,74 \pm 4,67
	14	934,23 \pm 93,42	190,95 \pm 19,09	102,71 \pm 10,27	640,57 \pm 64,06
	21	943,00 \pm 24,36	68,14 \pm 6,81	15,42 \pm 1,54	560,00 \pm 16,00
	30	1383,30 \pm 138,33	361,14 \pm 36,11	400,72 \pm 40,07	621,45 \pm 62,14
	40	2896,70 \pm 289,67	641,71 \pm 64,17	472,86 \pm 47,29	1782,13 \pm 178,21
	50	676,13 \pm 67,61	173,45 \pm 17,34	226,24 \pm 22,62	276,44 \pm 27,64
	60	181,29 \pm 18,13	32,10 \pm 3,21	46,08 \pm 4,61	103,10 \pm 10,31
	75	78,63 \pm 7,86	36,67 \pm 3,67	52,77 \pm 5,28	10,81 \pm 1,08
	90	82,77 \pm 8,30	17,18 \pm 1,90	60,43 \pm 5,90	53,06 \pm 6,00
Restante parte edível	0	69,23 \pm 18,88	24,52 \pm 2,45	37,35 \pm 6,92	7,36 \pm 5,64
	7	225,66 \pm 4,72	60,43 \pm 2,01	34,46 \pm 1,15	43,59 \pm 1,56
	14	246,09 \pm 20,46	131,78 \pm 7,54	51,39 \pm 6,43	62,92 \pm 6,48
	21	219,05 \pm 20,46	111,42 \pm 3,71	57,60 \pm 1,92	50,04 \pm 14,82
	30	302,96 \pm 6,29	203,10 \pm 8,34	163,83 \pm 5,46	63,96 \pm 7,51
	40	337,87 \pm 23,60	281,43 \pm 10,95	188,90 \pm 9,44	132,45 \pm 3,21
	50	264,19 \pm 18,88	154,01 \pm 5,13	174,27 \pm 5,81	64,08 \pm 7,94
	60	249,80 \pm 11,02	158,31 \pm 5,28	141,43 \pm 4,71	49,83 \pm 1,02
	75	274,66 \pm 22,03	182,79 \pm 9,24	132,14 \pm 7,55	40,26 \pm 5,24
	90	190,14 \pm 5,90	151,17 \pm 6,00	104,83 \pm 4,10	15,95 \pm 2,60

Tabela A.6 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a 50 µg Cu l⁻¹ durante 25 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cu (nmol g ⁻¹)			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	77,51 ± 7,75	17,11 ± 1,71	20,14 ± 2,01	40,25 ± 4,03
	7	803,56 ± 80,36	281,07 ± 66,34	221,98 ± 22,20	200,51 ± 8,18
	14	910,00 ± 41,03	294,88 ± 9,49	336,02 ± 13,60	379,00 ± 17,94
	21	962,00 ± 105,57	249,55 ± 4,95	302,04 ± 10,20	511,00 ± 90,41
	25	1097,99 ± 142,85	380,79 ± 38,10	440,44 ± 44,00	676,77 ± 120,70
Glândula Digestiva	0	263,40 ± 26,34	20,80 ± 2,08	84,54 ± 8,45	158,06 ± 15,81
	7	801,60 ± 80,16	241,78 ± 24,18	308,71 ± 30,87	251,11 ± 25,11
	14	1930,03 ± 193,00	584,96 ± 58,50	725,44 ± 72,54	619,63 ± 61,96
	21	2033,00 ± 153,39	528,90 ± 42,89	686,14 ± 48,61	1118,83 ± 61,88
	25	2199,13 ± 270,00	623,22 ± 92,30	757,33 ± 85,70	1418,59 ± 191,90
Restante parte edível	0	69,23 ± 3,73	24,52 ± 2,45	37,35 ± 6,92	7,36 ± 5,64
	7	303,24 ± 15,16	194,94 ± 25,48	220,21 ± 11,01	111,92 ± 21,33
	14	385,90 ± 28,74	242,00 ± 15,06	244,64 ± 12,23	100,74 ± 1,45
	21	576,05 ± 13,07	232,75 ± 8,49	196,05 ± 9,80	147,26 ± 5,23
	25	607,39 ± 29,20	426,87 ± 19,70	354,22 ± 15,60	213,70 ± 11,00

Tabela A.7 – Concentração (nmol g⁻¹) (média ± σ) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas durante 90 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Zn (nmol g ⁻¹)			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	2106 ± 149	1581 ± 204	1282 ± 135	757 ± 189
	7	1844 ± 192	1393 ± 139	638 ± 72	686 ± 187
	14	1750 ± 175	1298 ± 136	653 ± 72	401 ± 33
	21	1530 ± 153	1162 ± 244	379 ± 73	410 ± 163
	30	1522 ± 146	1160 ± 109	338 ± 32	311 ± 5
	40	1775 ± 169	1297 ± 135	285 ± 132	193 ± 98
	50	1726 ± 182	1309 ± 131	196 ± 43	222 ± 8
	60	1522 ± 146	957 ± 100	209 ± 56	356 ± 10
	75	1730 ± 201	1205 ± 135	184 ± 31	341 ± 35
	90	1639 ± 262	1338 ± 191	337 ± 31	336 ± 40
Glândula Digestiva	0	2249 ± 328	1473 ± 126	1274 ± 143	1473 ± 59
	7	2100 ± 203	1678 ± 164	1280 ± 110	958 ± 70
	14	2141 ± 214	1558 ± 166	1312 ± 143	828 ± 95
	21	1555 ± 163	1317 ± 124	723 ± 65	685 ± 28
	30	1496 ± 152	896 ± 85	562 ± 40	539 ± 25
	40	2137 ± 251	1130 ± 120	446 ± 33	562 ± 57
	50	1658 ± 159	1034 ± 101	698 ± 71	574 ± 14
	60	1796 ± 175	1567 ± 191	499 ± 24	570 ± 40
	75	1598 ± 258	1015 ± 97	555 ± 33	529 ± 128
	90	1628 ± 323	997 ± 95	477 ± 49	554 ± 179
Restante parte edível	0	849 ± 37	329 ± 39	178 ± 25	157 ± 28
	7	1081 ± 36	433 ± 110	645 ± 125	202 ± 99
	14	1090 ± 60	519 ± 119	746 ± 73	175 ± 32
	21	816 ± 53	603 ± 82	398 ± 46	185 ± 74
	30	817 ± 48	588 ± 205	315 ± 40	266 ± 97
	40	710 ± 358	588 ± 246	672 ± 75	250 ± 37
	50	867 ± 55	606 ± 87	408 ± 41	247 ± 72
	60	998 ± 74	716 ± 96	254 ± 24	228 ± 46
	75	1079 ± 73	746 ± 115	360 ± 39	227 ± 81
	90	1043 ± 90	809 ± 191	542 ± 53	291 ± 53

Tabela A.8 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a $100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

		Concentração de Zn (nmol g^{-1})			
Tecido	Dias	Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	2106 \pm 149	1581 \pm 204	1282 \pm 135	757 \pm 189
	7	2809 \pm 199	1062 \pm 99	1061 \pm 96	885 \pm 13
	14	2888 \pm 226	1857 \pm 190	850 \pm 144	581 \pm 107
	21	2749 \pm 210	1863 \pm 180	901 \pm 125	615 \pm 95
	30	2705 \pm 212	1065 \pm 147	1071 \pm 275	969 \pm 10
	40	2913 \pm 236	1646 \pm 163	1442 \pm 130	1024 \pm 56
	50	2678 \pm 200	1246 \pm 130	1386 \pm 127	845 \pm 57
	60	2425 \pm 176	1371 \pm 132	1039 \pm 342	614 \pm 3
	75	1827 \pm 159	1343 \pm 119	909 \pm 51	425 \pm 11
	90	2058 \pm 195	1250 \pm 133	918 \pm 92	290 \pm 30
Glândula Digestiva	0	2249 \pm 328	1473 \pm 126	1274 \pm 143	1473 \pm 59
	7	3139 \pm 310	1796 \pm 175	1624 \pm 90	1519 \pm 45
	14	3875 \pm 585	1976 \pm 186	1735 \pm 200	1564 \pm 99
	21	2612 \pm 272	1637 \pm 153	1440 \pm 140	1064 \pm 21
	30	3537 \pm 355	1744 \pm 185	1589 \pm 127	1303 \pm 43
	40	3755 \pm 375	2270 \pm 179	1924 \pm 140	1861 \pm 56
	50	3372 \pm 343	1366 \pm 127	1289 \pm 62	1516 \pm 154
	60	2521 \pm 257	1655 \pm 197	1181 \pm 44	1184 \pm 16
	75	2075 \pm 209	1340 \pm 131	1232 \pm 66	803 \pm 12
	90	2425 \pm 351	1139 \pm 115	1021 \pm 140	785 \pm 97
Restante parte edível	0	849 \pm 37	329 \pm 39	178 \pm 25	157 \pm 27
	7	1182 \pm 112	937 \pm 96	548 \pm 59	103 \pm 43
	14	1274 \pm 162	816 \pm 82	561 \pm 56	103 \pm 11
	21	1105 \pm 111	958 \pm 102	1022 \pm 104	175 \pm 95
	30	1191 \pm 120	969 \pm 97	1077 \pm 114	255 \pm 90
	40	1230 \pm 129	1129 \pm 119	583 \pm 48	481 \pm 37
	50	1506 \pm 145	1099 \pm 120	437 \pm 39	129 \pm 14
	60	1178 \pm 107	1088 \pm 109	207 \pm 24	117 \pm 25
	75	1115 \pm 120	1005 \pm 102	387 \pm 35	276 \pm 17
	90	1494 \pm 212	1063 \pm 187	345 \pm 39	140 \pm 14

Tabela A.9 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a $1000 \mu\text{g Zn l}^{-1}$ durante 40 dias e depuradas durante 50 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Zn (nmol g^{-1})			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	2106 \pm 149	1581 \pm 51	1282 \pm 135	757 \pm 36
	7	2904 \pm 227	2240 \pm 221	918 \pm 113	965 \pm 106
	14	4276 \pm 361	3073 \pm 319	1071 \pm 112	1032 \pm 271
	21	4382 \pm 374	3188 \pm 435	979 \pm 420	1815 \pm 180
	30	5814 \pm 461	4408 \pm 431	1675 \pm 104	3031 \pm 374
	40	9956 \pm 931	6280 \pm 621	1879 \pm 308	3496 \pm 403
	50	5522 \pm 475	4508 \pm 378	1631 \pm 125	3338 \pm 280
	60	5170 \pm 428	3899 \pm 381	1067 \pm 449	1803 \pm 502
	75	5029 \pm 658	4199 \pm 375	755 \pm 296	2076 \pm 405
	90	5046 \pm 822	4093 \pm 545	1066 \pm 148	1887 \pm 171
Glândula Digestiva	0	2249 \pm 328	1473 \pm 126	1274 \pm 143	1473 \pm 59
	7	2406 \pm 265	1063 \pm 208	534 \pm 60	2135 \pm 32
	14	2779 \pm 251	1074 \pm 191	1047 \pm 98	1873 \pm 38
	21	5809 \pm 578	2023 \pm 215	1598 \pm 160	2088 \pm 203
	30	8371 \pm 1053	5418 \pm 150	2256 \pm 222	1496 \pm 680
	40	8136 \pm 1824	5423 \pm 224	2415 \pm 156	2697 \pm 544
	50	4949 \pm 386	2472 \pm 158	1536 \pm 86	1641 \pm 142
	60	4221 \pm 427	1963 \pm 236	1326 \pm 100	1731 \pm 91
	75	4149 \pm 417	2518 \pm 126	1123 \pm 37	1257 \pm 255
	90	4248 \pm 497	1772 \pm 205	1320 \pm 44	1355 \pm 248
Restante parte edível	0	849 \pm 37	329 \pm 39	178 \pm 25	157 \pm 27
	7	1473 \pm 142	1193 \pm 107	926 \pm 100	810 \pm 65
	14	1586 \pm 209	1106 \pm 112	1024 \pm 106	544 \pm 80
	21	1803 \pm 273	1732 \pm 202	685 \pm 73	614 \pm 27
	30	2512 \pm 249	1881 \pm 199	554 \pm 49	777 \pm 19
	40	4150 \pm 418	2661 \pm 308	1261 \pm 97	1628 \pm 135
	50	3515 \pm 349	2073 \pm 238	595 \pm 68	846 \pm 430
	60	3952 \pm 388	2615 \pm 168	527 \pm 53	810 \pm 167
	75	4227 \pm 467	2662 \pm 215	554 \pm 89	711 \pm 163
	90	3007 \pm 223	2020 \pm 185	452 \pm 112	565 \pm 73

Tabela A.10 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cd (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias.
(Total – tecido total; FI – fração subcelular insolúvel; FEPM – fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM – fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cd (nmol g^{-1})			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	5,57 \pm 1,41	1,39 \pm 0,37	1,51 \pm 0,42	2,25 \pm 0,62
	7	469,71 \pm 29,52	151,62 \pm 15,16	63,59 \pm 6,36	254,50 \pm 8,00
	14	612,36 \pm 45,48	114,68 \pm 11,47	50,04 \pm 5,00	447,64 \pm 29,01
	21	763,74 \pm 57,90	225,25 \pm 22,52	60,77 \pm 6,08	477,71 \pm 29,29
	25	780,00 \pm 40,03	202,71 \pm 20,27	61,21 \pm 12,61	486,07 \pm 83,64
Glândula Digestiva	0	30,10 \pm 7,89	4,48 \pm 0,95	9,58 \pm 1,52	15,70 \pm 5,19
	7	1009,20 \pm 119,60	234,41 \pm 45,45	112,14 \pm 23,18	762,65 \pm 50,97
	14	1206,63 \pm 139,11	262,55 \pm 73,59	151,51 \pm 62,55	892,57 \pm 20,97
	21	1220,24 \pm 152,72	268,98 \pm 80,02	171,30 \pm 82,34	879,96 \pm 19,61
	25	1253,00 \pm 174,80	354,25 \pm 65,65	124,27 \pm 35,31	874,47 \pm 73,83
Restante parte edível	0	2,58 \pm 0,72	0,95 \pm 0,20	1,38 \pm 0,31	1,19 \pm 0,45
	7	117,01 \pm 11,70	57,85 \pm 5,78	17,71 \pm 1,77	41,46 \pm 4,15
	14	206,85 \pm 20,69	104,94 \pm 10,49	32,03 \pm 3,20	69,88 \pm 6,99
	21	339,72 \pm 72,84	109,91 \pm 20,95	35,48 \pm 3,55	194,33 \pm 48,34
	25	389,41 \pm 84,13	154,33 \pm 43,26	32,63 \pm 6,32	202,45 \pm 45,45

Tabela A.11 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Cu (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias.

(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Cu (nmol g^{-1})			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	77,51 \pm 7,75	17,11 \pm 1,71	20,14 \pm 2,01	40,25 \pm 4,03
	7	357,89 \pm 25,79	157,58 \pm 10,76	139,26 \pm 18,93	161,05 \pm 26,11
	14	450,18 \pm 15,02	209,76 \pm 60,98	172,61 \pm 51,26	267,81 \pm 12,78
	21	809,66 \pm 40,97	258,43 \pm 59,84	251,87 \pm 29,19	499,36 \pm 25,94
	25	888,66 \pm 61,87	287,15 \pm 37,15	206,27 \pm 46,27	565,24 \pm 53,52
Glândula Digestiva	0	263,40 \pm 26,34	20,80 \pm 2,08	84,54 \pm 8,45	158,06 \pm 15,81
	7	658,10 \pm 55,81	160,09 \pm 16,01	206,19 \pm 20,62	291,81 \pm 19,18
	14	748,26 \pm 54,83	176,86 \pm 7,69	228,42 \pm 12,84	342,98 \pm 34,30
	21	1848,16 \pm 114,82	382,20 \pm 28,22	353,41 \pm 25,34	1112,55 \pm 61,26
	25	1794,93 \pm 89,49	220,62 \pm 12,06	272,57 \pm 17,26	1301,74 \pm 60,17
Restante parte edível	0	69,23 \pm 3,73	24,52 \pm 2,45	37,35 \pm 6,92	7,36 \pm 5,64
	7	153,57 \pm 9,36	70,41 \pm 7,04	80,34 \pm 13,03	102,82 \pm 10,72
	14	142,50 \pm 8,25	60,11 \pm 6,01	53,00 \pm 10,30	129,38 \pm 18,06
	21	157,02 \pm 14,70	71,96 \pm 7,20	54,44 \pm 10,44	130,62 \pm 29,40
	25	402,15 \pm 40,21	289,44 \pm 28,94	142,42 \pm 19,24	170,28 \pm 17,90

Tabela A.12 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de Zn (total e frações subcelulares) nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas expostas a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias.
(Total – tecido total; FI - fração subcelular insolúvel; FEPM - fração subcelular de elevado peso molecular; FBPM - fração subcelular de baixo peso molecular).

Tecido	Dias	Concentração de Zn (nmol g^{-1})			
		Total	FI	FEPM	FBPM
Brânquias	0	2106 \pm 149	1581 \pm 204	1282 \pm 135	757 \pm 189
	7	1623 \pm 247	719 \pm 107	535 \pm 76	370 \pm 64
	14	2863 \pm 263	763 \pm 151	360 \pm 54	1740 \pm 58
	21	1988 \pm 153	787 \pm 84	1027 \pm 109	974 \pm 40
	25	1680 \pm 151	496 \pm 53	1147 \pm 107	837 \pm 29
Glândula Digestiva	0	2249 \pm 328	1473 \pm 126	1274 \pm 143	1473 \pm 59
	7	5221 \pm 525	1415 \pm 146	1446 \pm 146	2359 \pm 233
	14	2868 \pm 283	761 \pm 72	726 \pm 68	1382 \pm 143
	21	2043 \pm 207	1287 \pm 125	839 \pm 89	717 \pm 57
	25	3166 \pm 306	2606 \pm 274	1397 \pm 159	1236 \pm 127
Restante parte edível	0	849 \pm 37	329 \pm 39	178 \pm 25	157 \pm 27
	7	1131 \pm 122	685 \pm 73	688 \pm 76	241 \pm 27
	14	1048 \pm 107	695 \pm 68	795 \pm 84	642 \pm 45
	21	1103 \pm 108	877 \pm 81	826 \pm 77	600 \pm 49
	25	1122 \pm 112	1013 \pm 96	781 \pm 78	673 \pm 61

Tabela A.13 – Concentração (nmol g^{-1}) (média $\pm \sigma$) de MT nas brânquias, glândula digestiva e restante parte edível, em amêijoas não contaminadas e expostas a Cd (4 e $40 \mu\text{g l}^{-1}$) e Zn (100 e $1000 \mu\text{g l}^{-1}$) durante 40 dias e depuradas durante 50 dias e expostas a Cu (25 e $50 \mu\text{g l}^{-1}$) e a uma mistura metálica ($100 \mu\text{g Cd l}^{-1} + 50 \mu\text{g Cu l}^{-1} + 100 \mu\text{g Zn l}^{-1}$) durante 25 dias.

		Concentração de MT (nmol g ⁻¹)							
Tecido	Dias	Controlo	Cd		Cu		Zn		Mistura metálica
			4 µg l ⁻¹	40 µg l ⁻¹	25 µg l ⁻¹	50 µg l ⁻¹	100 µg l ⁻¹	1000 µg l ⁻¹	
Brânquias	0	330 ± 33	330 ± 33	330 ± 33	324 ± 66	324 ± 66	291 ± 91	291 ± 91	330 ± 75
	7	366 ± 37	361 ± 36	533 ± 43	461 ± 57	534 ± 76	407 ± 80	451 ± 51	801 ± 69
	14	352 ± 35	387 ± 39	550 ± 45	534 ± 67	663 ± 105	510 ± 90	710 ± 120	870 ± 96
	21	352 ± 40	438 ± 44	586 ± 49	521 ± 102	889 ± 131	538 ± 88	792 ± 12	1035 ± 135
	25/30	354 ± 35	410 ± 41	595 ± 50	581 ± 73	809 ± 128	506 ± 62	781 ± 111	990 ± 240
	40	340 ± 34	412 ± 41	605 ± 51	913 ± 205		480 ± 80	837 ± 97	
	50	384 ± 38	403 ± 40	526 ± 43	701 ± 112		314 ± 74	552 ± 115	
	60	319 ± 32	343 ± 34	473 ± 41	531 ± 123		361 ± 71	540 ± 54	
	75	357 ± 36	369 ± 37	455 ± 55	445 ± 167		288 ± 68	448 ± 104	
90	291 ± 29	352 ± 35	432 ± 42	420 ± 142		365 ± 85	401 ± 88		
Glândula Digestiva	0	698 ± 80	698 ± 80	698 ± 80	798 ± 140	798 ± 140	752 ± 92	752 ± 92	810 ± 120
	7	669 ± 67	647 ± 65	810 ± 71	915 ± 40	1000 ± 242	581 ± 71	842 ± 102	1380 ± 240
	14	703 ± 70	845 ± 86	956 ± 86	890 ± 232	1057 ± 9	755 ± 105	777 ± 97	1920 ± 96
	21	656 ± 66	819 ± 82	1041 ± 94	977 ± 50	1399 ± 241	659 ± 79	677 ± 87	2310 ± 258
	25/30	608 ± 70	865 ± 87	1059 ± 96	1072 ± 102	1763 ± 204	677 ± 87	819 ± 109	2280 ± 192
	40	690 ± 69	819 ± 82	1039 ± 94	1116 ± 107		715 ± 95	853 ± 113	
	50	654 ± 65	724 ± 72	824 ± 72	981 ± 156		685 ± 85	808 ± 108	
	60	630 ± 63	667 ± 67	834 ± 73	876 ± 67		846 ± 106	910 ± 110	
	75	659 ± 76	749 ± 77	813 ± 81	868 ± 110		805 ± 105	904 ± 144	
90	590 ± 49	621 ± 52	723 ± 62	876 ± 43		714 ± 44	832 ± 122		
Restante parte edível	0	282 ± 28	282 ± 28	282 ± 28	282 ± 24	282 ± 24	269 ± 89	269 ± 89	277 ± 29
	7	331 ± 33	318 ± 32	312 ± 31	321 ± 18	442 ± 26	415 ± 75	449 ± 99	629 ± 91
	14	278 ± 28	285 ± 29	369 ± 37	385 ± 59	554 ± 24	361 ± 71	535 ± 75	686 ± 71
	21	301 ± 30	287 ± 29	393 ± 39	329 ± 12	592 ± 66	312 ± 72	489 ± 59	854 ± 131
	25/30	285 ± 29	341 ± 34	375 ± 37	394 ± 48	521 ± 36	390 ± 60	464 ± 54	871 ± 114
	40	305 ± 39	352 ± 40	442 ± 44	503 ± 56		391 ± 81	539 ± 99	
	50	344 ± 34	342 ± 34	387 ± 39	371 ± 32		440 ± 70	411 ± 61	
	60	353 ± 37	284 ± 26	379 ± 38	347 ± 43		315 ± 65	336 ± 86	
	75	346 ± 35	312 ± 31	440 ± 44	335 ± 35		338 ± 78	335 ± 55	
90	269 ± 27	316 ± 41	466 ± 47	336 ± 31		306 ± 76	353 ± 64		

